



**FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**

Caracterização de Cutinase imobilizada em matriz de sol-gel

Mário Rui Lopes Dias Da Fonseca

Lisboa
2008



Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, realizada sob a orientação científica de **Prof. Doutor Susana Barreiros (FCT-UNL)**, **Prof. Doutor Isabel Sá Nogueira (ITQB-UNL)**, **Prof. Doutor Luís Fonseca (IST-UTL)**, **Prof. Doutor João Carlos Lima (FCT-UNL)** e co-orientação de **Eng. Pedro Vidinha (FCT-UNL)**.



Agradecimentos

Aos Orientadores e Co-orientadores desta tese, por me mostrarem o caminho a seguir, sempre com compreensão, paciência e clareza. Por vezes o espírito fica enevoado e todos puxaram por mim nos momentos certos, para dar o melhor de mim ao trabalho.

Aos colegas de todas as instituições por onde passei (demasiados para enumerar...). Todos sem exceção demonstraram ser bons colegas e amigos. O espírito de entreajuda e camaradagem esteve bem presente em todas as fases do trabalho.

Aos colegas do Departamento de Química da FCT, Lab. 427, que fizeram com que a ciência fosse sempre uma festa.

Aos meus amigos por aturarem as minhas preocupações e desabafos ao longo deste ano.

À minha família, que sempre me apoiou nos momentos mais decisivos para que encontrasse o meu rumo na vida.

Resumo:

Neste trabalho procedeu-se a alterações na sequência de aminoácidos da cutinase. Obtiveram-se os mutantes *E. Coli* (células WK6) L189W e *E. Coli* N84W-L182C.

Efectuaram-se crescimentos celulares, tendo-se obtido:

Tabela 1 – Massa total de cutinase obtida nas produções e respectiva pureza.

	N84W-L182C	L189W
Massa total (mg)	211	44
Pureza (%)	~60	~55

Realizou-se ainda a caracterização de cutinase imobilizada em sol-gel de composição TMOS/MTMS, TMOS/ETMS, TMOS/PTMS e TMOS/BTMS, recorrendo às técnicas de espectroscopia de fluorescência e anisotropia.

A adição de um grupo cisteína na posição 182 ao mutante N84W (mutante N84W-L182C) aproximou a resposta de intensidade de fluorescência e λ_{\max} à cutinase nativa.

O mutante L189W mostrou-se semelhante à cutinase nativa.

A análise da anisotropia foi inconclusiva, devido a desnaturação da cutinase (mutante e nativa).

Os dados experimentais recolhidos não foram suficientes para esclarecer na totalidade as interacções entre cutinase e matriz de sol-gel.

Abstract:

In the present work cutinase mutants N84W-L182C and L189W were obtained using *E.Coli* as a host.

Protein production yielded:

Tabela 2 – Total cutinase mass and purity.

	N84W-L182C	L189W
Massa total (mg)	211	44
Pureza (%)	~60	~55

Sol-gel immobilized cutinase was characterized by Fluorescence Spectroscopy and Anisotropy.

The cysteine addition at position 182 of the N84W mutant, resulted in a wt type behavior, indicating quenching of the added tryptophan.

L189W cutinase mutant displayed fluorescence typical of wt cutinase, indicating that the lateral tryptophan has no response to the matrix polarity.

Anisotropy analysis was not carried out due to protein denaturation

Experimental data was not conclusive about protein/ matrix interactions.





“She Blinded Me With Science”

Thomas Dolby (1982)

Abreviaturas utilizadas:

E. Coli – Escherichia Coli

a_w – Actividade termodinâmica da água

BSA – Albumina do soro de bovinos

BTMS – Butil-trimetoxisilano

CO₂ – Dióxido de carbono

EXETMOS – 2-(3,4-epoxiciclohexil)etil-trimetoxisilano

GC – Cromatógrafo gasoso

IBTMS – Isobutil-trimetoxisilano

MTMS – Metil-trimetoxisilano

NaA – forma sódica do zeólito A

NaF – fluoreto de sódio

NaY – forma sódica do zeólito Y

OCTMS – Octil-trimetoxisilano

PVA – álcool polivinílico

PTMS – Propil-trimetoxisilano

PHTMS – Fenil-trimetoxisilano

R – Razão água/silano

rpm - Rotações por minuto

sc-CO₂ – Dióxido de carbono supercrítico

SEM – microscopia electrónica de varrimento

SHTMS – 3-Mercaptopropil-trimetoxisilano

TMOS – Tetrametoxisilano

OD – Densidade óptica

STE – Tampão Sacarose, Tris, EDTA

Índice

Resumo	4
Introdução Teórica	
Biocatálise	11
Biocatálise em meios não convencionais	12
Dinâmica molecular	13
Modificação de Proteínas	14
Estudos de modelação	15
Modificação química	16
<i>Bio-imprinting</i>	18
Engenharia Genética	18
Mutagenese dirigida	19
Mutagenese aleatória	22
Imobilização	22
Lipases	26
Cutinase	28
Métodos Experimentais	
Mutação	31
Produção e purificação	32
Método Lowry	33
Preparação sol-gel	34
Fluorescência	35

**Apresentação e discussão de resultados**

Mutantes Cutinase	36
Produção e purificação	42
Imobilização	43
Intensidade de banda e λ_{\max}	48

Conclusões	54
-------------------	----

Bibliografia	55
---------------------	----

Anexos

Anexo 1	62
Anexo 2	64
Anexo 3	65
Anexo 4	67
Anexo 5	69
Anexo 6	70
Anexo 7	81

Introdução Teórica

Biocatálise

A biocatálise, como a palavra sugere, refere-se a transformações químicas utilizando enzimas. Esta, tem acompanhado a vida dos seres humanos desde tempos remotos, sendo exemplo as transformações químicas necessárias para a produção de produtos alimentares como o pão, queijo e cerveja. Nos dias de hoje com a identificação de novas enzimas, a biocatálise expandiu os seus horizontes, sendo também aplicada na indústria farmacêutica, na medicina em sistemas de análise, na protecção ambiental e bioremediação [1].

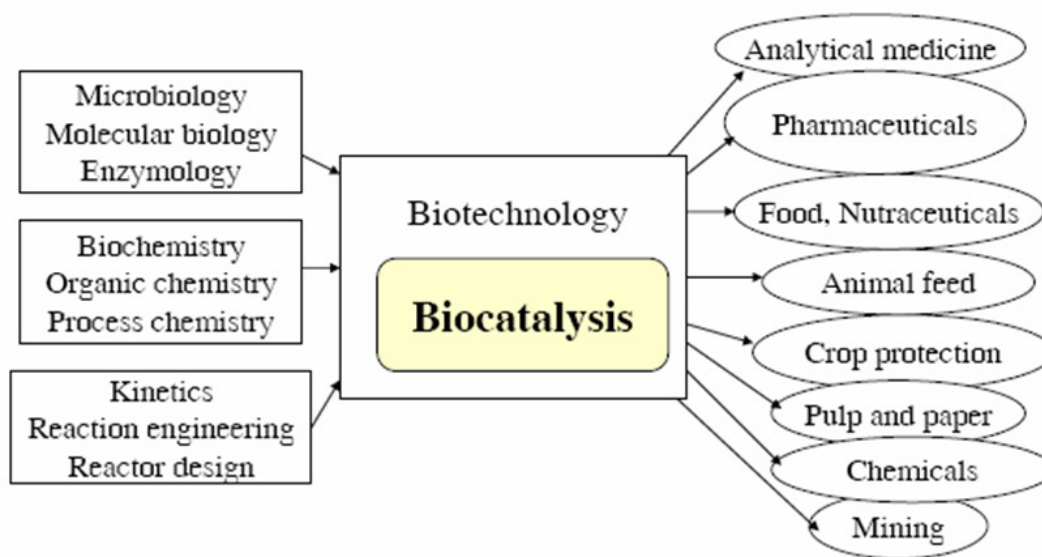


Figura 1 – Áreas de aplicação da biocatálise [1].

Com as preocupações ambientais a ocuparem cada vez mais tempo de discussão por todo o mundo, as reacções catalisadas por enzimas são cada vez mais estudadas para substituir a tradicional síntese química. Comparando os dois processos de síntese, verifica-se que as reacções catalisadas por enzimas geram menos produtos secundários devido à elevada selectividade e especificidade, as reacções ocorrem em condições mais suaves de pH e temperatura e produzem-se resíduos ambientalmente seguros. [2]

Actualmente as desvantagens da utilização de enzimas são:

- **Baixa estabilidade no meio reaccional.** Reflecte uma das principais preocupações quando se utilizam enzimas em processos industriais, dado que para se obterem elevadas taxas de conversão, a estabilidade é determinante.
- **Pouca diversidade para reacções específicas.** Apesar de se conhecerem enzimas capazes de catalisar qualquer reacção, em muitos casos o processo não está bem caracterizado, está sujeito a patentes ou não existem no mercado versões comerciais de enzima.
- **Processo de desenvolvimento longo.** O processo de produção a nível industrial de acrilamida levou 20 anos a ser desenvolvido. Como tal, é necessário muito tempo para fazer frente aos processos de síntese química. [1]

Biocatálise em meios não convencionais

Só em 1930 é que a biocatálise começou a ser estudada em solventes orgânicos quase totalmente hidrofóbicos. [3]

Contrariamente ao que se esperava, as enzimas demonstram actividade mesmo quando o meio contém pouca água. O meio aquoso convencional era um problema para a síntese de compostos de interesse comercial. A água apresentava-se como um mau solvente porque os compostos sintetizados na química industrial ficavam instáveis em meios aquosos. Além disso, a utilização destes meios obrigava a um passo adicional de secagem, tornando o processo industrial mais lento e com maiores custos. [4]

Só em 1984 é que se chegou à conclusão que os melhores solventes para biocatálise não eram hidrofílicos. Os trabalhos de Zacks e Klivanov (1984) [5] demonstraram a termoestabilidade das lipases em solventes orgânicos.

Por outro lado, em meios com reduzida quantidade de água, a enzima adquire uma estrutura mais rígida e mantém a sua actividade sem ser necessário recorrer a imobilização. [5]

Temos portanto, vantagens na utilização de meios não convencionais em biocatálise como se esquematiza na tabela 2:

Tabela 3 – Características da catálise

Vantagens da utilização de meios não convencionais
- Aumento da solubilidade dos substratos apolares
- Desvio do equilíbrio termodinâmico para a síntese e não para a hidrólise
- Recuperação do produto mais simples devido aos pontos de ebulição mais baixos
- Maior estabilidade de enzimas e risco de desnaturação minimizado
- Possibilidade de alteração da selectividade incluindo quimió, regiô e enantio-selectividades assim como da especificidade para substratos.

Dinâmica molecular

Para se trabalhar com enzimas é necessário controlar diversos parâmetros do meio. Um dos principais parâmetros é a hidratação. A água funciona como lubrificante molecular [7], permitindo que a enzima demonstre as suas capacidades catalíticas mantendo a sua estrutura tridimensional. É necessário atingir um determinado nível de hidratação para que a enzima demonstre actividade catalítica [8,9] mas demasiada água pode provocar um salto energético suficiente para a enzima atingir a desnaturação. [7]

Não é a quantidade de água no solvente orgânico que dita a mudança de actividade da enzima mas sim a quantidade vs solubilidade de água. [1]

Este parâmetro designa-se actividade termodinâmica da água e representa-se por a_w . Temos assim uma medida da quantidade de água disponível no sistema reaccional que reflecte as interacções entre a água e os restantes componentes do sistema.

Fixando a_w , os efeitos de solvente devido a diferentes partições de água entre as fases em presença são eliminados, tornando possível o estudo da actividade de enzimas em diversos solventes. [10,11]

Um dos métodos utilizados para fixar este valor é a utilização de soluções saturadas de sais que estabelecem um equilíbrio vapor fixo em determinado solvente. Utilizando este método podemos verificar qual o valor óptimo de a_w para se obter a actividade máxima de uma enzima num determinado solvente. Como exemplo disso temos um estudo da transesterificação de butirato de vinil com n-octanol utilizando a lipase de *Pseudomonas Cepacia*, onde os valores de K_M aumentam com o aumento de actividade de água, atingindo-se a velocidade máxima de reacção com a_w entre 0.11 e 0.38 [12]. Se o solvente utilizado é polar, podemos modificar o parâmetro a_w através da adição de pequenas quantidades de água como relatam Bell et al. [13]

Outro dos parâmetros a ter em conta é o efeito do solvente. Além dos já referidos efeitos da afinidade para a água de cada solvente (solventes hidrofílicos vs hidrofóbicos), temos também de ter em conta a solvatação. Consoante a solvatação de substratos /produtos, altera-se a cinética ou equilíbrio da reacção. Se o solvente tiver um bom poder de solvatação para um determinado substrato, este irá ficar menos acessível ao centro activo da enzima, resultando em menor eficiência catalítica. [14]

Foi possível correlacionar a relação entre solvatação e cinética enzimática com experiências realizadas em meios com pouca água (micelas invertidas ou solventes orgânicos apolares de modo a manter a estrutura da enzima intacta) [15,16]

Modificação de proteínas

Aquando da escolha de um catalisador biológico, é necessário atingir um compromisso entre actividade e estabilidade. Do mesmo modo que uma proteína com pouca actividade se torna indesejável, o mesmo se passa com uma enzima pouco estável.

Uma actividade baixa significa que a velocidade de reacção será necessariamente baixa, tornando o processo menos eficiente e uma menor estabilidade implica menos ciclos de utilização, o que acarreta maiores custos de produção. Assim, de forma a tornar a biocatálise cada vez mais competitiva, a modificação de proteínas apresenta-se como uma realidade promissora. Através desta, modificam-se estruturas de enzimas, optimizando-as para condições reaccionais específicas. Por exemplo, no trabalho de Didier Rotticci et al., modificou-se a enantioselectividade e estereoespecificidade da CALB através de mutações dirigidas. [17]

Estudos de modelação

A capacidade de alterar a estrutura de uma enzima abre novas portas para a síntese química, fazendo com que cada enzima seja alterada especificamente para uma determinada reacção. Para este efeito, realizam-se estudos de modelação, onde se encontram as explicações para determinadas propriedades, alterações de actividade e estabilidade e selectividade [18]. Como exemplo de estudos realizados com vista à melhoria da enantioselectividade, temos os realizados em lipases de triacilglicerol de *Candida antarctica* [19], *Candida rugosa* [20], *Humicola lanuginosa* [21], *Pseudomonas cepacia* [22,23], *Rhizopus oryzae*, e *Rhizomucor miehei* [24].

Passemos então a analisar as várias estratégias de modificação de enzimas.

Modificação química – Esta técnica vulgarizou-se no fim da década de 50. Surgiu como um método para analisar a estrutura de proteínas de modo a investigar os estados físico-químicos dos resíduos de aminoácidos e identificar que resíduos participavam na função da proteína. Com o evoluir da técnica, na década de 70 a modificação química começou a ser utilizada para modificar propriedades e até fornecer novas funções a proteínas com vista à optimização de processos de síntese. As modificações são feitas pela síntese de derivados de polietilenoglicol (PEG). As cadeias de PEG estabelecem ligações covalentes com as enzimas como se pode ver na figura [25]:

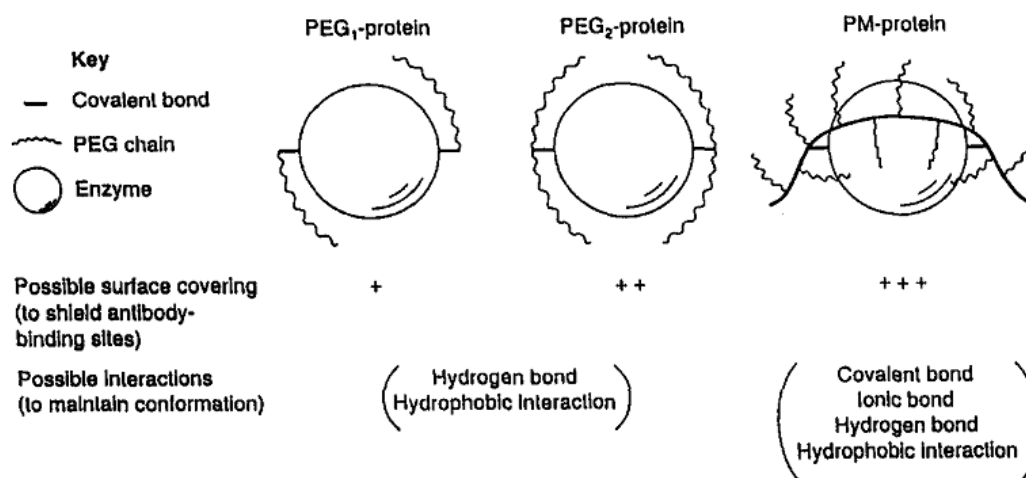


Figura 2 – Modelos para a relação estrutural entre modificadores e proteína. [25]

Dada a natureza anfipática da cadeia de PEG, foi possível melhorar a solubilização das enzimas tanto em meios aquosos como em meios orgânicos. [26-27] Como exemplo temos o artigo de Yuji Inada et al., onde complexos de proteínas com fins terapêuticos e PEG demonstram uma imunoreactividade reduzida, maiores tempos de *clearance* e maior estabilidade. [28]

Como exemplos de alterações de propriedades de enzimas por este método temos:

- Síntese de ésteres a partir de ácidos carboxílicos e álcoois pode ser catalisada por “enzimas PEG” num solvente orgânico homogéneo
- As reacções de síntese de esteres podem ser realizadas sem recorrer a solventes orgânicos perigosos
- Maior actividade hidrolítica em amidas (apolares) comparando com a enzima nativa.
- Possibilidade da síntese estereoespecífica de esteres em condições hidrofóbicas.
- Condições de reacção mais suaves
- Termoestabilidade de enzimas melhorada tanto em meios hidrofóbicos como em solução aquosa. [25]

O factor determinante para o sucesso de uma modificação química é o grau de modificação da enzima. Este pode ser controlado pela adição de PEG à solução de enzima. Verifica-se que um nível baixo de modificação (poucas moléculas de PEG ligadas a aminoácidos) não é suficiente para solubilizar as enzimas em solventes orgânicos, ao mesmo tempo que um grau elevado de modificações provoca uma redução da actividade enzimática devido a alterações estruturais.

A maior desvantagem deste método reside na utilização de substratos de peso molecular elevado. Para a reacção enzimática ocorrer, é necessário a formação de um complexo intermediário, o complexo enzima-substrato. As caudas de PEG ocupam o centro activo de tal modo que este complexo praticamente não se forma, não ocorrendo por isso reacção. [27]

Bio-imprinting

O conceito de *imprinting* foi descrito por Wulff em 1972 [28]. Resumidamente, um polímero é formado à volta de uma molécula que irá actuar como molde. Deste modo, quando se remove a molécula, o polímero retém as propriedades dos grupos funcionais da molécula. Quando aplicou o conceito em biopolímeros [30,31], o resultado foi notável, representando uma boa alternativa aos métodos de modificação química. O *bio-imprinting* de lipases com ácidos gordos demonstrou um aumento da actividade catalítica em solventes orgânicos. [32]

Nesta técnica é adicionado um ligando ao centro activo da enzima em solução aquosa, formando-se um complexo enzima-substrato. Seguidamente seca-se o meio reaccional e retira-se o ligando do centro activo. A limitação de água disponível no meio assegura que a enzima permanece aprisionada na sua conformação [33]. A estrutura permanece então rígida e adaptada ao ligando anteriormente ligado ao centro activo. O efeito é como se a enzima se lembrasse do ligando a que esteve ligado. [34]

Engenharia genética:

A engenharia genética fornece um conjunto de métodos importantes para a evolução de proteínas. Os seus métodos consistem na mutação de um ou mais nucleótidos num gene, que irá depois codificar uma proteína diferente da nativa. No caso da indústria, o objectivo destas modificações passa pela melhoria da actividade catalítica, melhoria da estabilidade e maior especificidade.

A mutagénesis divide-se em dois grupos, podendo ser dirigida ou aleatória.

Mutagênese dirigida – Consiste na mutação de uma zona conhecida de DNA.

O ponto de partida é invariavelmente o conhecimento da sequência de aminoácidos da proteína. Realizam-se então estudos de modelação, elaboram-se modelos a 3 dimensões da proteína, discute-se o efeito desejado e quais as modificações que a enzima necessita de sofrer para o fim desejado.

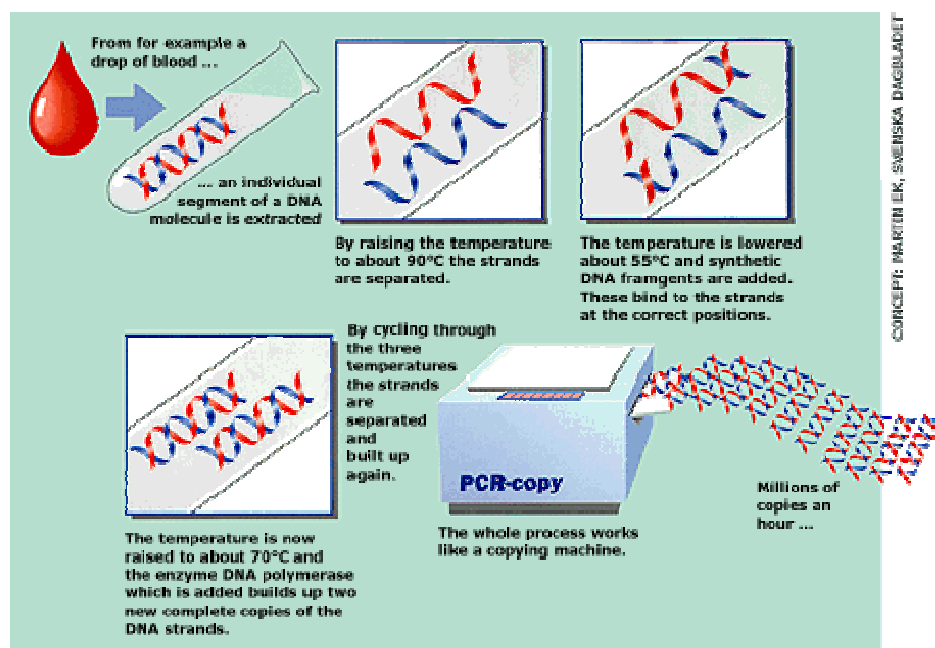


Figura 3 – Linhas gerais do processo PCR. [34]

Depois das devidas considerações, parte-se para a determinação e isolamento do gene a mutar e realizam-se as mutações pretendidas. Um dos passos fundamentais para a mutação é a amplificação do gene. Para tal, tira-se partido das características de síntese da polimerase num processo que dá pelo nome de *polymerase chain reaction* (PCR).

Resumidamente a PCR consiste em ciclos de temperatura onde ocorrem a separação das cadeias duplas de DNA em cadeias simples, o emparelhamento de um primer em cada cadeia simples e a formação de novas cadeias duplas a partir do primer (a polimerase vai formando a cadeia dupla utilizando como template a cadeia simples) [1].

O primeiro método descrito para a mutagenese baseava-se em dois passos de PCR sucessivos. Primeiro desenhavam-se primers a partir do ponto de mutação para a extremidade 5' e 3' do gene (primers sense e antisense). Ficavam deste modo dois fragmentos do gene que eram depois fundidos na primeira PCR, recriando o gene na íntegra com a mutação já introduzida. Seguia-se então o segundo passo de PCR para amplificação do gene:

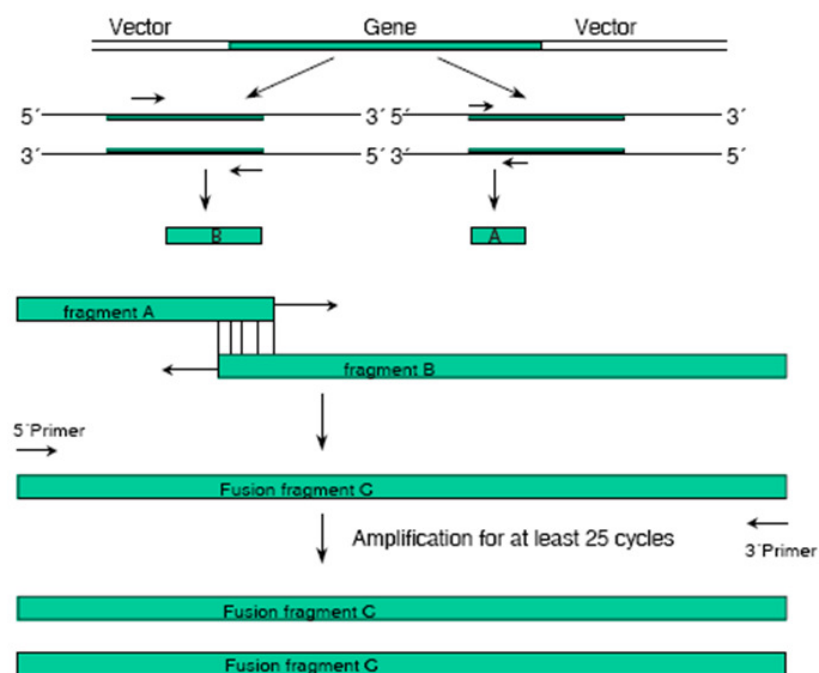


Figura 4 – Esquema para o Método PCR de fusão [35]

Apesar do sucesso do método, este revelava-se pouco eficiente porque a PCR pode introduzir erros no gene e a amplificação do fragmento de fusão revelava-se difícil.

Hoje em dia, com o aparecimento de kits concebidos especificamente para mutagenese, a indução de mutações tornou-se bastante simples e eficiente, como se ilustra na figura seguinte:

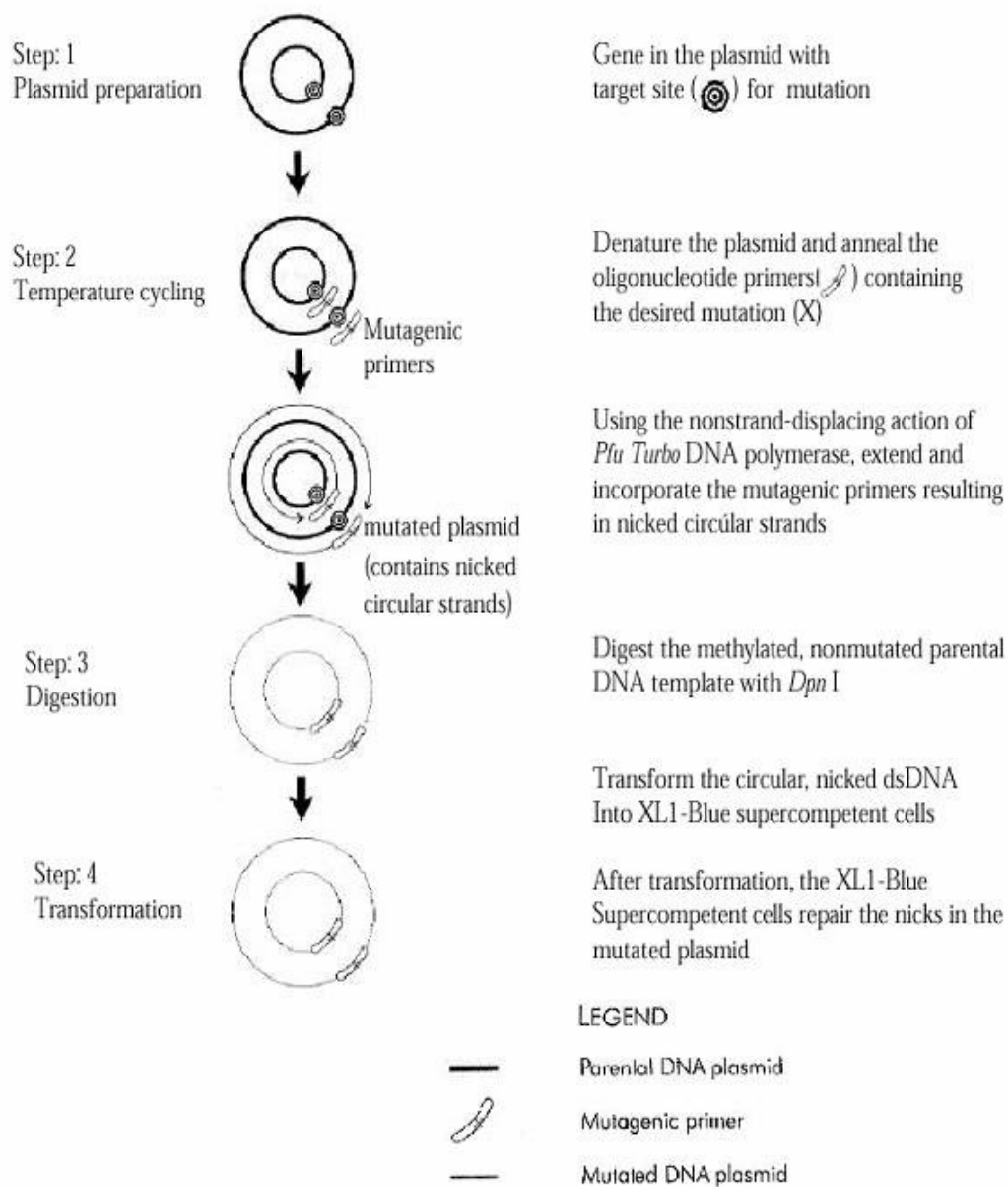


Figura 5 – Esquema do kit de mutagéneses da marca Stratagene [36]

Existem outros métodos para induzir mutações, tais como *combined chain reaction* (CCR) descrito por Stambrook [37] e o método de Kunkel [38], cada um deles com as suas vantagens e desvantagens.

Mutagénesse aleatória – Este processo mimica a evolução que ocorre na natureza. É verdadeiramente a aplicação do conceito de selecção natural acelerado num tubo de ensaio. É um método utilizado para analisar as propriedades de proteínas nativas, melhorar a actividade específica e até conferir novas funções a uma enzima.

O procedimento envolve um passo de PCR em condições propícias à introdução de erros na incorporação de nucleótidos. Os fragmentos de PCR são então clonados e incorporados em células hospedeiras com vista à expressão das novas proteínas. Os resultados da expressão são analisados e verificam-se os que afectaram a actividade da proteína. [39]

Imobilização

Recorrendo ou não a métodos de modificação, a imobilização é outra das estratégias utilizadas para adaptar uma enzima para determinada reacção.

Existem diversas metodologias para confinar biocatalisadores a um espaço.

O factor mais importante a ter em conta na escolha da técnica de imobilização é a interacção entre a enzima e a matriz. Esta interacção influenciará a actividade e estabilidade, sendo crucial a escolha de um processo adequado às necessidades específicas da reacção.

A **adsorção** é um dos métodos mais simples de aplicar mas a força de ligação entre o suporte e a superfície sólida é fraca. Devido a este facto, é comum haver perda de enzima para o meio reaccional mesmo em meios não aquosos onde a enzima é insolúvel. [40]

Mesmo com a melhor das imobilizações, a desorção pode ocorrer por alterações impostas pelo meio reaccional (pH, temperatura) e mesmo por ligação da enzima a contaminantes presentes no substrato, produção de produto ou outras condições que conduzam à alteração na conformação da proteína. [42,43]

A enzima também pode ser imobilizada através de ligações covalentes, resultando em maior estabilidade. Uma das grandes desvantagens é a menor actividade catalítica, uma vez que as ligações entre a enzima e o suporte limitam a mobilidade conformacional.

A ligação ocorre entre os grupos funcionais presentes na superfície do suporte e os resíduos de aminoácidos na enzima. [44,45]

A imobilização pela técnica **sol-gel** [45] representa um grande avanço para a biocatálise. Apesar de se conhecer a técnica desde meados de 1930 [46], na década de 70 S. Teichner e G.A. Nicolaon [46] introduziram o tetrametoxisilano (TMOS). Ao haver a substituição de silicatos de sódio por óxidos metálicos, o sol-gel é sintetizado num só passo formando o que designaram por alcogel, referindo-se o nome à hidrólise do TMOS numa solução de metanol. A secagem deste alcogel com um fluido supercrítico (qualquer substância a uma temperatura e pressão superiores ao seu ponto crítico), dá origem a aerogeis de sílica de excelente qualidade [47], sendo os fluidos supercríticos completamente eliminados não deixando qualquer tipo de resíduos. Este método apresenta-se como uma boa estratégia para se atingirem as exigências da classificação de processo amigo do ambiente. [48]

No caso de o alcogel ser deixado a secar em contacto com a atmosfera, toma o nome de xerogel. A diferença entre os aerogeis e xerogeis reside na quantidade de ar, sendo que um xerogel é mais denso porque contém menos quantidade de ar.

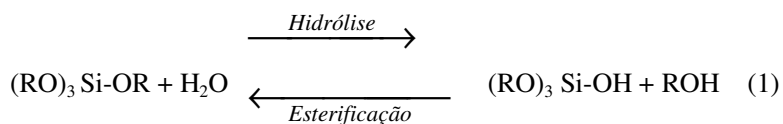
A remoção de água do gel é acompanhada por alterações na estrutura e rede de poros. A estrutura porosa onde a enzima é imobilizada contém poros de elevado volume, através dos quais ocorre a difusão das espécies reactivas. Assim, as espécies com peso molecular baixo e médio podem interagir livremente com o biocatalisador. [49]

As grandes vantagens de uma imobilização em sol-gel são o aumento da actividade e estabilidade, possibilidade de vários ciclos de reutilização, armazenamento à temperatura ambiente sem degradação da enzima, síntese em condições suaves à temperatura ambiente, estrutura nativa não se altera (caso geral) e uma percentagem de imobilização elevada

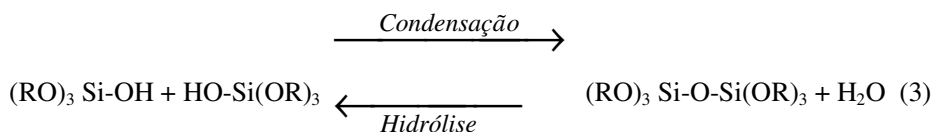
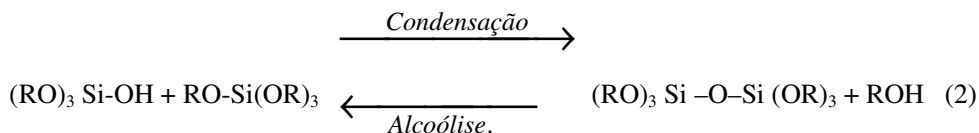
O estudo de Daryl *et al* [51] incidiu sob as proteínas lisozima, alfa-lactalbumina, metamioglobina e apomioglobina. Apresenta-se como um bom exemplo das vantagens e desvantagens da utilização desta técnica. Verificou-se uma desnaturação parcial de lisozima, alfa-lactalbumina e metamioglobina. Apesar desta desvantagem, conseguiu-se aumentar a estabilidade térmica e eliminou-se o problema de agregação que as enzimas apresentavam em alguns solventes.

No caso da apomioglobina, a desnaturação foi total, ficando a enzima inutilizada. As causas da desnaturação não foram descobertas, colocando-se a hipótese do conteúdo em água dos poros da matriz.

O processo de sol-gel consiste numa reacção de hidrólise, na qual ocorre substituição dos grupos alcóxido (OR) por grupos hidroxilo, com formação de grupos silanol (Si-OH).



Em seguida ocorre o processo de condensação em que pode haver libertação de água ou álcool, com a formação de ligações silano (Si-O-Si). O grau de condensação dos precursores alcóxido é limitado pela sua própria hidrólise:



A velocidade das reacções de formação do sol-gel altera a estrutura tridimensional da matriz. As velocidades são afectadas pela natureza e quantidade dos precursores, pela presença de espécies ácidas ou básicas, pelo tipo de solvente, pela razão água/silano, a temperatura, a ordem e/ou a velocidade de adição dos vários compostos. [52-54]

A velocidade de hidrólise é muito afectada pela razão água/silano (R). Será maior com o aumento de R, pois aumenta a probabilidade de colisão entre as moléculas de água e sílica. Se as quantidades de água forem tão elevadas que $R \gg 4$, a velocidade de hidrólise é independente de R, uma vez que deixam de existir limitações difusionais. Apesar de um valor elevado para R se apresentar como uma vantagem, pode ocorrer imiscibilidade dos precursores.

Podemos portanto, relacionar alterações na microestrutura e morfologia com o grau de aglomeração e interligação das partículas. [55]

No presente trabalho, utilizou-se a catálise básica. Nesta, a hidrólise ocorre rapidamente, formando-se ácidos mono ou disilícílicos que actuam como núcleos para o crescimento. Ficamos assim, com muitas partículas de pequenas dimensões que através de agregação irão formar a matriz tridimensional. Como as espécies de sílica são pouco reactivas, processo de agregação é lento (ao contrário da hidrólise). [56]

Se tivesse sido utilizada a catálise ácida, a velocidade da hidrólise seria menor e consequentemente, a formação de núcleos de crescimento seria mais lenta. Como tal, a condensação e hidrólise ocorrem praticamente em simultâneo, formando-se partículas de maiores dimensões. Neste caso as espécies de sílica são muito reactivas, uma vez que estão carregadas negativamente, tornando o processo de condensação muito rápido. [57]

LIPASES

Pertencem ao grupo de serina hidrolases, demonstrando elevada estabilidade, mesmo em solventes orgânicos e a temperaturas elevadas. Têm sido amplamente utilizadas com álcoois e esteres racémicos, bem como para processos enantioselectivos envolvendo álcoois secundários [58]. Como estas enzimas não requerem co-factores [59], os custos envolvidos num processo industrial serão menores, tornando-as muito atractivas para as biotransformações industriais.

Devido à sua enantioselectividade, as lipases têm sido alvo de estudos de modelação molecular para modificar o seu centro activo, de modo a melhorar ou modificar a capacidade de uma enzima para uma reacção específica [60]

Outra característica intrínseca das lipases é o seu mecanismo para reacção. O seu centro activo encontra-se normalmente coberto por uma tampa, anfifílica, constituída por aminoácidos polares na parte externa e por aminoácidos apolares na parte interna, em contacto com o centro activo. [61] Uma das excepções a este mecanismo é a Lipase B de *Cândida antarctica*, que não tem tampa.

A tampa permanece fechada em meios aquosos, ficando o centro activo inacessível. O centro activo só fica exposto quando a tampa abre, ou seja, a enzima só catalisa uma reacção interfaces hidrofóbicas-hidrofílicas, ou ainda na presença de um solvente hidrofóbico. O mecanismo de passagem de conformação fechada para conformação aberta é designado por activação interfacial. [62, 63]

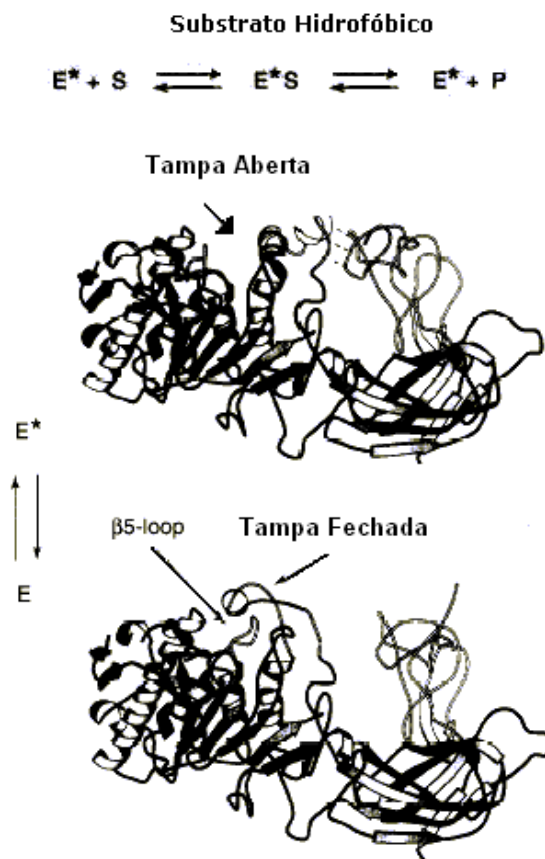


Figura 6 – Representação do mecanismo de tampa das lipases [64].

As lipases são amplamente utilizadas na indústria dos detergentes [65], na produção de compostos enanteomericamente puros na indústria farmacêutica [66], entre outras, sendo ainda de destacar a produção de biodiesel [67].

Cutinase:

É uma enzima extra celular produzida naturalmente pelo fungo *Fusarium solani pisi*. Degrada a cutina, o polímero estrutural constituinte da cutícula das plantas superiores [68].

Esta enzima pertencente ao grupo das hidrolases, extensivamente utilizado em biotransformações industriais [69].

É detentora de uma elevada estabilidade devido às suas características estruturais. Com uma massa molecular de 22kD e 197 resíduos apresenta-se como uma proteína globular relativamente pequena [68].

Devido às suas características atractivas para a biocatálise, tem sido utilizada em vários estudos, sendo de maior importância para este trabalho o artigo publicado por Pedro Vidinha et al, [41] que demonstrou as potencialidades da associação do processo de imobilização em sol-gel na imobilização da cutinase.

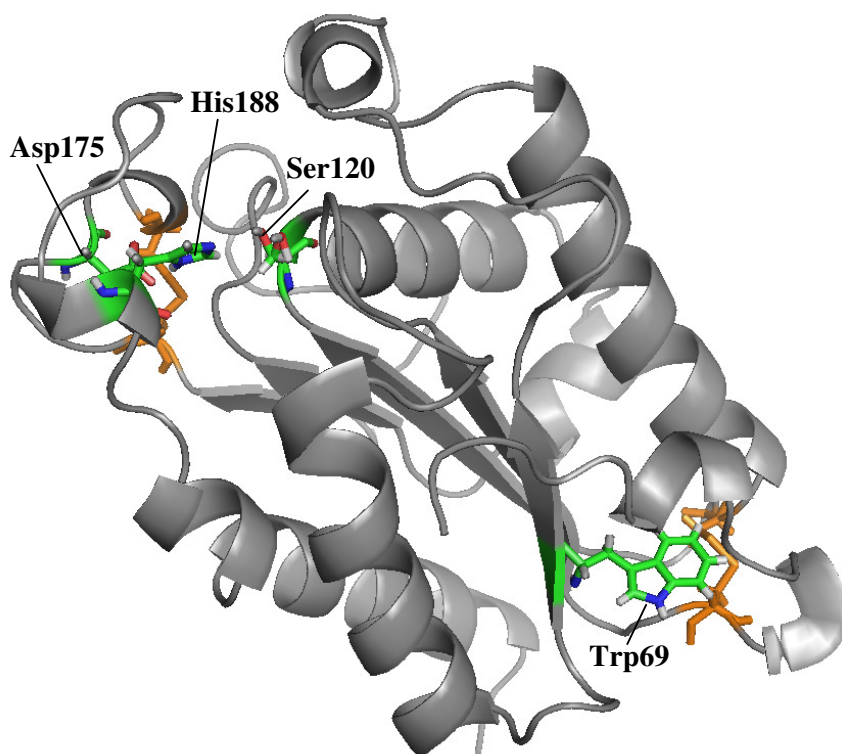


Figura 7 – Representação da cutinase, dando destaque ao grupo triptofano na posição 69 e ao centro activo constituído pela tríade catalítica Serina 120, Histidina 188, Aspartato 175.

O centro activo da cutinase é constituído por uma tríade catalítica (Serina 120, Histidina 188, Aspartato 175) e pela cavidade de ligação ao oxanião, a qual é formada por dois átomos de azoto pertencentes a duas ligações peptídicas (Serina 42 e Glutamina 121) e pela cadeia lateral do resíduo Serina 42. A posição do grupo hidroxilo deste resíduo é orientada por duas ligações de hidrogénio com os azotos dos resíduos Asparagina 84 e Glutamina 121 [61].

Esta enzima tem características muito desejáveis. Ao contrário das lipases, não funciona pelo mecanismo de “tampa”, estando o centro activo acessível ao substrato. Além disso, durante o mecanismo catalítico das lipases, quando o substrato se liga forma-se a cavidade de ligação ao oxanião, que ajuda à estabilização dos compostos intermediários. No caso da cutinase, a cavidade de ligação ao oxanião está pré-formada, apenas se alterando a orientação dos resíduos que cobrem parcialmente o centro activo. Devido a estas duas características, não existe activação interfacial na cutinase [61].

Sabe-se ainda que se trata de uma enzima enantioselectiva, sendo 100% selectiva para o enantiómero (*R*) feniletanol

Métodos experimentais:

O presente trabalho foi dividido em 3 estádios: Mutação, Produção e Espectroscopia

1-Mutação

Introduziram-se mutações na sequência de aminoácidos da cutinase, criando os mutantes L189W, N84W-L182C e N84W-L182C-V184L.

No caso do mutante L189W (modificação do codão TTG para TGG, plasmideo pMa/c5-CUF WT woMS como template) foi realizado um crescimento de células E.Coli WK6 pMa/c5-CUF WT woMS segundo o protocolo no anexo 2. Extraíu-se o DNA das células como descrito no anexo 3 e, utilizando o método de mutação dirigida QuikChange (Stratagene) anexo 4, procedeu-se à modificação da sequência de aminoácidos (E.Coli XL1 Blue como hospedeiro).

Para produzir o mutante N84W-L182C (codão TTG para TGG), foi utilizado o mesmo método do mutante L189W. A única modificação foi a utilização do plasmideo pMa/c5-CUF N84W como template. (para a mutação N84W utilizou-se o plasmideo com mutação silenciosa pMa/c5-CUF WT).

Obteve-se ainda um mutante que não estava planeado, cutinase N84W-L182C-V184L devido a um erro no primer.

Todas as mutações foram confirmadas por sequenciação.

Expressão de Proteína

Para verificar que as estirpes obtidas produziam cutinase, realizaram-se crescimentos dos mutantes *E.Coli*, utilizando o protocolo descrito no anexo 5.

Como meio de comparação das quantidades de proteína produzidas, utilizaram-se ainda células de *E.Coli* WK6 com os plasmídeos pMa/c5-CUF WT (wild type), pMa/c5-CUF WT woMS (sem mutação silenciosa) e pMa/c5-CUF DEL (mutante de deleção).

As proteínas produzidas foram analisadas recorrendo a um gel SDS-PAGE (12,5%), utilizando as fracções solúveis e insolúveis.

Devido a diferenças entre os protocolos de produção de cutinase do ITQB e IST, foi ainda realizada uma produção à pequena escala (10 ml de meio fermentação) segundo os protocolos de cada instituição, sendo os resultados analisados por gel SDS-PAGE (12,5%)

Produção e purificação de cutinase

Produziu-se cutinase mutante L189W, N84W-L182C segundo o protocolo experimental apresentado no anexo 6.

Para a purificação de proteínas utilizou-se um sistema ÄKTApurifier™ UPC100 acoplado a duas colunas de cromatografia Pharmacia XK50, estando uma empacotada com resina DEAE e a outra empacotada com resina Q-sepharose.

O sistema ÄKTApurifier™ UPC100 não estava programado. Por isso, desenharam-se os programas de purificação de cutinase, respeitando os parâmetros experimentais do sistema anterior (Pharmacia Bio-Pilot). Para tal, fez-se uma adaptação das instruções que se encontravam nos programas do sistema antigo, utilizando a linguagem de programação do sistema actual. Desenvolveu-se ainda todo o protocolo de purificação de cutinase, baseado no protocolo anterior desenvolvido pelo IST-UTL.

IMOBILIZAÇÃO

Método de Lowry

Para a determinação da pureza das proteínas, recorreu-se ao método de Lowry modificado.

Utilizaram-se as seguintes soluções:

Solução A – Carbonato de sódio 5 % (p/v)

Solução 2 – Tartarato de sódio e potássio a 2% (p/v)

Solução 3 – Solução aquosa de sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) a 2% (p/v)

Reagente Lowry : Adicionaram-se 0,25 ml de solução 2 a 0,25 ml de solução 3 perfazendo-se até 25 ml com solução A. A adição da solução 2 deverá ocorrer primeiro para evitar que ocorra precipitação.

Reagente de Folin-Ciocalteu diluído 1:2.

Solução Padrão de BSA a 200 $\mu\text{g/ml}$.

Preparou-se uma solução de cutinase 1mg/ml. Efectuaram-se diluições de 1:10 e 1:20 desta solução. Foram retirados 200 μl de cada diluição e adicionou-se 1ml do reagente de Lowry. Agitou-se no vortex. Ao fim de 10 minutos juntaram-se 200 μl de reagente de Folin-Ciocalteu. Agitou-se no vortex e esperou-se 30 min. Foi medida a absorvância a 750nm contra um branco. Este foi preparado da mesma forma mas utilizando 200 μl de água.

A recta de calibração foi obtida utilizando-se como padrão diluições de solução de BSA (20,50,100,150 µg/ml). Todas as determinações foram feitas em duplicado.

Imobilização em sol-gel

O método de imobilização foi baseado no método descrito por Vidinha *et al.* (2006). [71]

Foram preparados suportes TMOS/MTMS, TMOS/ETMS, TMOS/PTMS, TMOS/BTMS, utilizando cutinase wt de levedura, cutinase E.Coli L189W e N84W-L182C, utilizando 4 mg de enzima.

Os suportes de sol-gel foram preparados de acordo com a tabela 4.

Tabela 4 – Preparação de suportes de sol-gel

	H ₂ O (µl)	PVA (µl)	NaF (µl)	TMOS (µl)	2° Precursor (µl)	Tempo Agitação (s)
TMOS/MTMS	80.4	28.6	14.3	21.2	101.9	60
TMOS/ETMS	78.3	30.1	15	21.2	114.1	32
TMOS/PTMS	76.3	31.4	15.7	21.2	126.0	30
TMOS/BTMS	74.4	32.7	16.3	21.2	136.7	25

Num eppendorf de 2 mL (epp. 1), adicionou-se cutinase às soluções de PVA/NaF, de acordo com a tabela 3. A mistura foi agitada vigorosamente no vórtex durante 30 segundos. Num eppendorf de 1,5 ml (epp. 2) foi preparada a mistura de precursores, seguindo-se agitação no vortex. Os precursores foram então adicionados à mistura do eppendorf de 2ml, seguindo-se agitação de acordo com a tabela 4. Durante este passo ocorre um aquecimento da mistura reaccional, que foi por isso arrefecida em gelo. Os eppendorfs com sol-gel foram colocados durante 24 h a 4 °C para envelhecimento. A secagem foi depois realizada a 35 °C, durante mais 24 h.

O sol-gel formado foi então partido em pedaços com uma espátula e lavado na sequência que segue, realizada sob centrifugação (5400 rpm, 10 min cada uma das 3 etapas): 2mL de tampão fosfato (50 mM, pH = 7), 2 mL de acetona, 2 mL de n-pentano. O gel foi deixado a secar a 35°C e posteriormente à temperatura ambiente.

Fluorescência

Os espectros de fluorescência foram realizados num Horiba-Jobin-Yvon Spex Fluorolog 3.22, em *right angle*. Foi utilizada uma célula para sólidos desenvolvida para o efeito. Os dados espectrais foram analisados pelo software OriginLab utilizando a plugin “*Peak Analysis Tool*” disponível na página web do software.

APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

Design mutantes de cutinase

A cutinase wt tem um triptofano na sua sequência de aminoácidos (triptofano nativo), localizado na ponta oposta ao centro activo, como se pode ver na figura seguinte:

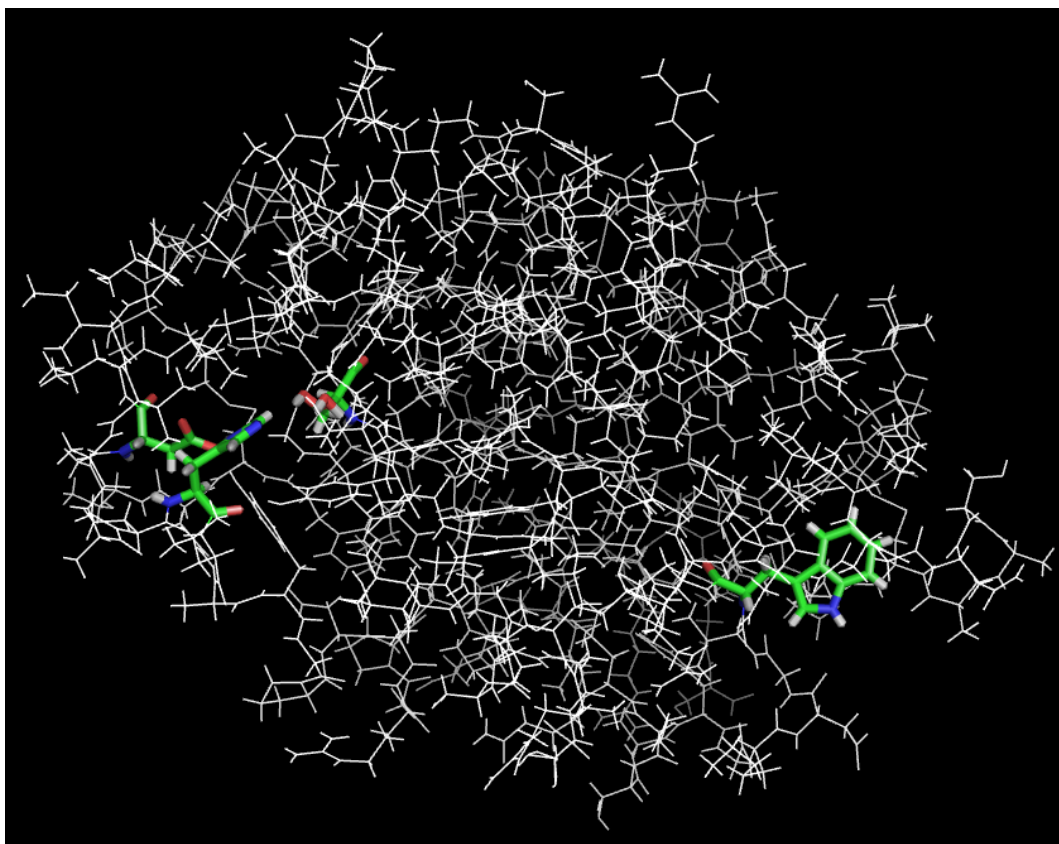


Figura 8 – Cutinase wt, evidenciando a tríade catalítica e triptofano nativo, representados por *sticks*.

Nos estudos de fluorescência será analisada a emissão do grupo triptofano.

Sabe-se que o triptofano nativo está ligado por ponte de hidrogénio ao resíduo Ala32 e bloqueado pela ponte de dicisteína na sua vizinhança.

Estudos anteriores de fluorescência com cutinase imobilizada em sol-gel revelaram uma tendência decrescente do valor de λ com o aumento da cadeia de sol-gel, indicando modificações na estrutura da enzima ou posições diferentes na matriz.

Perante todos estes dados, decidiu-se desenhar os mutantes N84W, N84W-L182C e L189W.

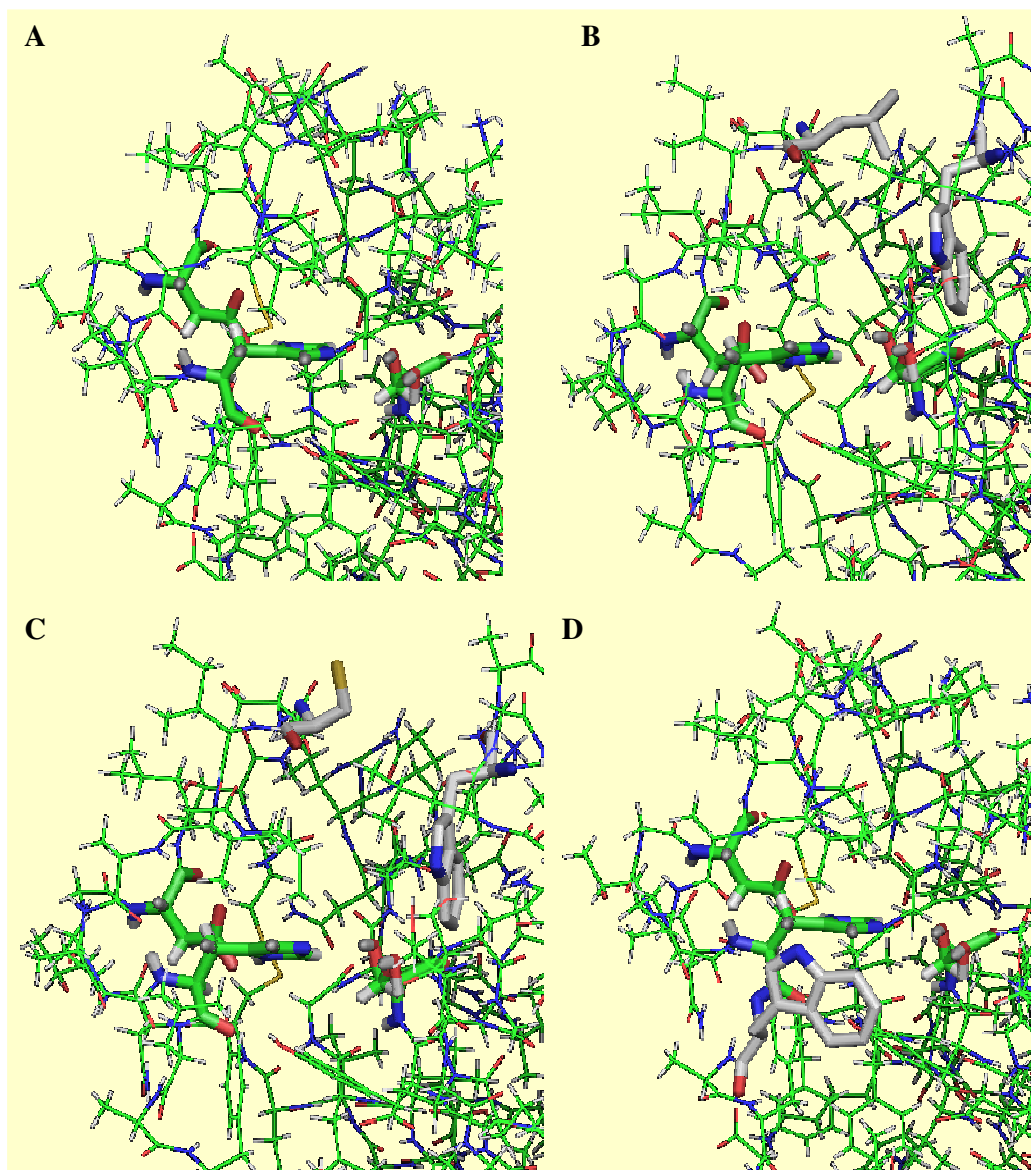


Figura 9 – A: Zona do centro activo de Cutinase wt, estando a tríade catalítica representada por *sticks*; B: Cutinase N84W, com o grupo triptofano adicional. Também se realça por *sticks* Leu182, substituído por cisteína em C. Tríade catalítica e leucina nativa representadas por *sticks*; C: Cutinase N84W-L189C, com as mutações representadas por *sticks*; D: Mutação L189W com grupo triptofano adicional.

As modificações na sequência de aminoácidos da enzima foram realizadas perto do centro activo.

Com a mutação N84W introduz-se um novo grupo triptofano. Deste modo, o centro activo fica bloqueado por um grupo volumoso e introduzimos um grupo fluoróforo numa posição oposta ao triptofano nativo.

Este mutante surgiu depois de se confirmar que não era possível mudar o triptofano nativo de sítio. Assim, ficamos com mais uma sonda de polaridade disponível, sendo que esta não está *quenched*.

Experiências realizadas com este mutante revelam uma redução drástica de a actividade sendo a actividade nula com substratos maiores que C₃. Pensou-se então em adicionar um grupo cisteína na vizinhança do triptofano. A substituição de Leucina por Cisteína poderá conferir características hidrofílicas perto do centro activo (hidrofóbico) e tornar a estrutura da proteína mais rígida na sua vizinhança. Sabe-se que a proximidade de grupos cisteína possibilita a formação de pontes dissulfídicas, além de uma possível estabilização do grupo triptofano por pontes de hidrogénio, mimetizando o fenómeno de *quenching* do triptofano nativo. Assim, a inclusão de uma cisteína na posição 182 parecia lógica para um estudo de emissão por fluorescência, por comparação com o mutante N84W-L182C e com a cutinase nativa.

Com o mutante L189W pretendeu-se verificar a emissão do grupo triptofano, numa zona diferente do mutante N84W. A posição 189 ocupa uma posição lateral na estrutura da enzima, sendo por isso um bom indicador da posição ocupada pela cutinase na matriz de sol-gel. Deste modo introduz-se um grupo triptofano numa posição diferente de N84W mas igualmente perto do centro activo da proteína.

Obtiveram-se os mutantes L189W, N84W-L182C e N84W-L182C-V184L recorrendo à técnica de mutação dirigida.

Inicialmente o plano de trabalhos não incluía a realização da mutação N84W-L182C-V184L, tendo sido obtida por mero acaso devido a um erro num dos *primers*. Como aparentemente esta mutação não traria qualquer informação adicional ao estudo de fluorescência, foi descartada e não passou às fases seguintes do trabalho.

Depois de confirmadas as mutações por sequenciação, realizou-se uma produção à pequena escala para verificar a produção, solubilidade e quantidade relativa de cutinase.

Os resultados da expressão proteica são apresentados na figura 10.

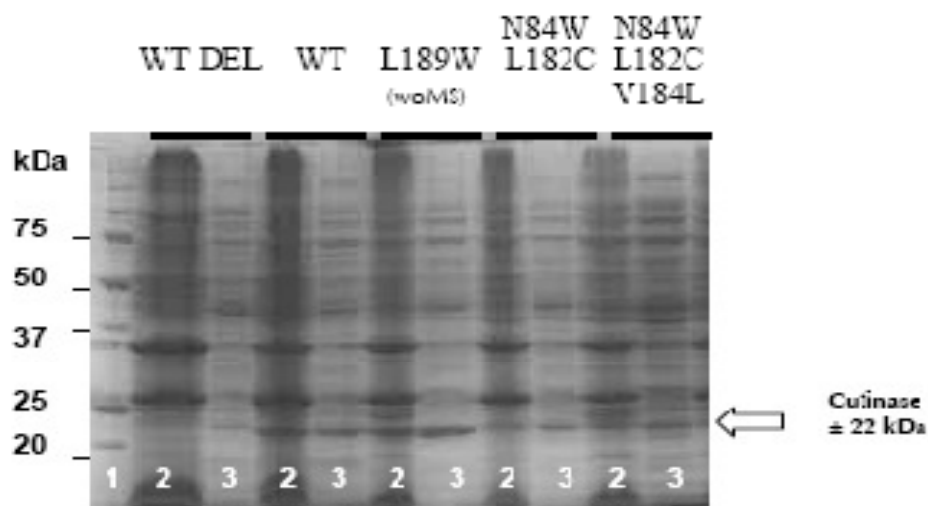


Figura 10 – Expressão de proteína, utilizando estirpes wt, wt DEL (controlo negativo, sem alelo cutinase) e mutantes em células E.Coli WK6. Separação por gel SDS-PAGE (12,5%). 1: *Protein mass Standards* (BioRad); 2: Fracção solúvel (10 µL); 3: Fracção insolúvel (20 µg).

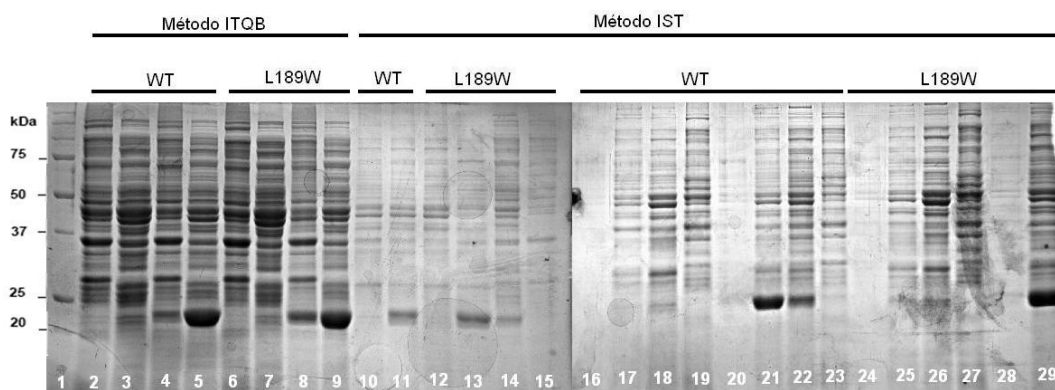
Verifica-se que os mutantes obtidos produzem cutinase (banda 22KDa) na fracção solúvel. Comparando as intensidades de banda, o mutante L189W produziu quantidades de proteína equivalentes à estirpe wt. No caso do mutante N84W-L182C e N84W-L182C-V184L, a intensidade da banda de cutinase é inferior às anteriormente referidas, indicando menor quantidade de proteína produzida. Como era de esperar, o mutante de deleção (WT DEL) não apresentou banda na zona de peso molecular da cutinase.

Em resultados anteriores aquando da produção (à larga escala) do mutante N84W (onde a mutação L182C e L182C-V184L assentam), verificou-se uma menor quantidade de unidades de cutinase N84W produzidas em relação a produções realizadas com mutante wt.

O plasmídeo que serviu de template às mutações foi diferente e pode ter tido um impacto determinante na quantidade de proteína expressada. No caso da mutação L189W, utilizou-se o plasmídeo pMa/c5-CUF WT woMS que não tem mutação silenciosa, enquanto que nos restantes mutantes, o plasmídeo template foi pMa/c5-CUF WT. A mutação silenciosa encontra-se no códon arginina na posição R196 e corresponde a uma mudança de códon de CGT para CGG.

De acordo com as tabelas de utilização de códões, o códon CGG é pouco utilizado, tendo por isso a mutação sido revertida para CGT. Os resultados de produção de cutinase wt com plasmídeo sem mutação silenciosa ainda não foram totalmente compreendidos mas aparentemente (e apesar da amostra ser muito pequena) produz o dobro das unidades/ litro de enzima.

Realizou-se ainda um teste para comparação entre a produção de cutinase pelo método ITQB e método IST. Devido às diferenças entre os dois métodos e principalmente devido às diferenças das concentrações de IPTG. Como é sabido, o IPTG (indutor) é tóxico para as células e pode fazer com que não exista crescimento celular após indução. Foi realizada uma produção à pequena escala e os resultados foram analisados recorrendo a um gel SDS-PAGE (12,5%).



- 1 – Marcador pesos moleculares
- 2,6 – Pellet sem indução
- 3,7 – Sobrenadante sem indução
- 4,8 – Pellet com indução
- 5,9 – Sobrenadante com indução
- 10,12 – pp ácida, sem indução
- 11,13 – pp ácida, com indução
- 14, 22 – Sobrenadante H₂O, com indução

- 15, 23 – Pellet H₂O, com indução
- 16, 24 – Meio fermentação, sem indução
- 17, 25 – Sobrenadante STE, sem indução
- 18, 26 – Sobrenadante H₂O, sem indução
- 19, 27 – Pellet, H₂O sem indução
- 20, 28 – Meio fermentação, com indução
- 21, 29 – Sobrenadante STE, com indução

Figura 11 – Gel SDS PAGE (12.5%) onde se compara as quantidades de enzima produzida pelo método ITQB vs IST.

Para a comparação entre os dois métodos, retiraram-se amostras em várias fases dos crescimentos, tendo sido comparados os crescimentos com e sem indução.

Verifica-se que qualquer dos métodos é apropriado para produzir cutinase, não representando a concentração elevada de IPTG um problema. É de realçar que na fase de precipitação ácida do método ITQB se perde grande parte da cutinase, mas por outro lado desaparecem quase todas as outras bandas, representando por isso um passo importante para obter uma pureza elevada.

Produção de cutinase

Foram realizados 3 períodos de produção de Cutinase, todos eles com *E.Coli* WK6.

No primeiro período tentou-se produzir mutante L182C e L189W. Devido a um erro desastroso e irreversível, toda a produção foi comprometida. Com efeito, o sobrenadante resultante da reacção com o tampão STE (Sacarose, Tris, EDTA) das duas produções foi descartado por engano. Como se pode ver pela figura 11, uma parte significativa da produção está neste passo. Como tal, não se avançou para o passo seguinte

No segundo período tentou-se mais uma vez a produção dos dois mutantes, tendo sido obtido apenas mutante L182C (211mg). Não foram descortinadas as razões pelas quais o mutante L189W não cresceu devido a falta de amostras retiradas durante a produção.

No terceiro e último período de produção, tentou-se produzir cutinase wt e L189W. Apenas foi obtido mutante L189W em quantidades muito baixas (44mg). As amostras retiradas aquando do crescimento e purificação ainda não foram analisadas mas pensa-se que terá sido um problema com a solução de IPTG. Foi utilizado IPTG de dois alíquotas diferentes e, dado que o crescimento celular foi normal (valores de OD e tempos previstos pelo descrito no protocolo), coloca-se a hipótese de numa das soluções o IPTG estar degradado. Estes dados serão confirmados nas próximas semanas.

Os gráficos de purificação apresentam-se no anexo 7, tendo sido retiradas as fracções correspondentes ao primeiro pico.

Depois de respeitados os tempos de diálise, procedeu-se à liofilização das amostras, tendo todo o processo decorrido dentro dos parâmetros normais.

Imobilização

Antes de se proceder à imobilização em sol-gel, foram determinadas as quantidades efectivas de proteína recorrendo ao método de Lowry. Apesar do método de Bradford ser mais prático, dada a rapidez com que se obtêm resultados, os sais de sódio (misturados com a proteína devido à eluição em gradiente de NaCl) podem interferir com a medida.

No método de Lowry a contaminação de sais de sódio não apresenta entraves. O reagente de Folin-Ciocalteu é reduzido pelas proteínas em solução alcalina, predominantemente pelos resíduos de tirosina e triptofano, formando um complexo cobre-proteína de cor azul com um máximo de absorção a 745-750nm. O cobre liga-se à proteína e facilita a transferência de electrões para o reagente de folin, particularmente na vizinhança de grupos funcionais aromáticos (como anéis de tirosina e triptofano).

Foi ainda utilizada cutinase wt de levedura, tendo a sua pureza também sido determinada. Obtiveram-se os seguintes resultados:

Tabela 5 – Massa total obtida nas produções e respectiva pureza.

	N84W-L182C	L189W	Wt, levedura
Massa total (mg)	211	44	N/A
Pureza (%)	~60	~55	~55

Uma vez que a quantidade de enzima produzida pelas duas estirpes foi baixa, seria de esperar que a pureza fosse igualmente baixa, isto é, como não se tem uma grande quantidade para purificação, retiram-se menos fracções e, obviamente, a cutinase resultante é menos pura.

Na posse destes dados, prosseguiu-se para a imobilização em sol-gel.

Numa tentativa de normalizar os resultados de fluorescência, todos os suportes foram preparados com 4mg de enzima.

Espectroscopia de Fluorescência

Para a caracterização dos suportes recorreu-se à espectroscopia de fluorescência, retirando-se os valores de comprimento de onda (λ_{max}) na intensidade máxima de emissão.

Os grupos triptofano, quando excitados (a 295nm) emitem radiação, correspondendo a intensidade máxima a um determinado comprimento de onda. Quanto maior o valor de λ_{max} , mais polar a vizinhança dos grupos triptofanos. A intensidade máxima fornece informação acerca da exposição do triptofano na proteína. Deste modo, recorrendo à espectroscopia de fluorescência, o grupo triptofano é utilizado como uma sonda interna para tentar clarificar a interacção entre proteína e matriz.

Nos estudos relatados por Vidinha *et al* [41], a actividade enzimática modifica-se com a alteração da composição da matriz de sol-gel. Com efeito, a actividade da enzima aumentava até cadeias de $n=4$ (de MTMS para BTMS), decrescendo a partir daí. Estes resultados revelam a verdadeira importância do estudo das interacções entre a proteína e a matriz, justificando a escolha destas composições de sol-gel.

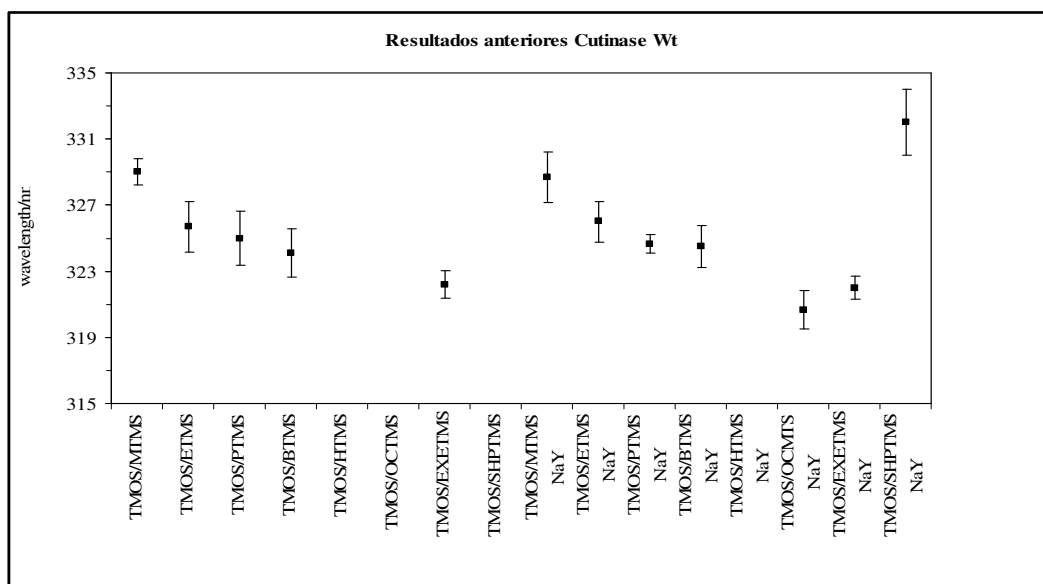


Gráfico 1 – Resultados obtidos com 4 mg de cutinase imobilizada em sol-gel de diversas composições. Apesar de se mostrarem os resultados de todas as composições analisadas, para este trabalho apenas se consideraram os resultados da sequência MTMS até BTMS.

Todos os resultados foram comparados com os resultados obtidos anteriormente com cutinase wt e cutinase N84W, tendo ainda sido reanalisados os suportes N84W (que entretanto ficaram armazenados em *eppendorfs* fechados à temperatura ambiente durante aproximadamente um ano).

Resultados Cutinase N84W

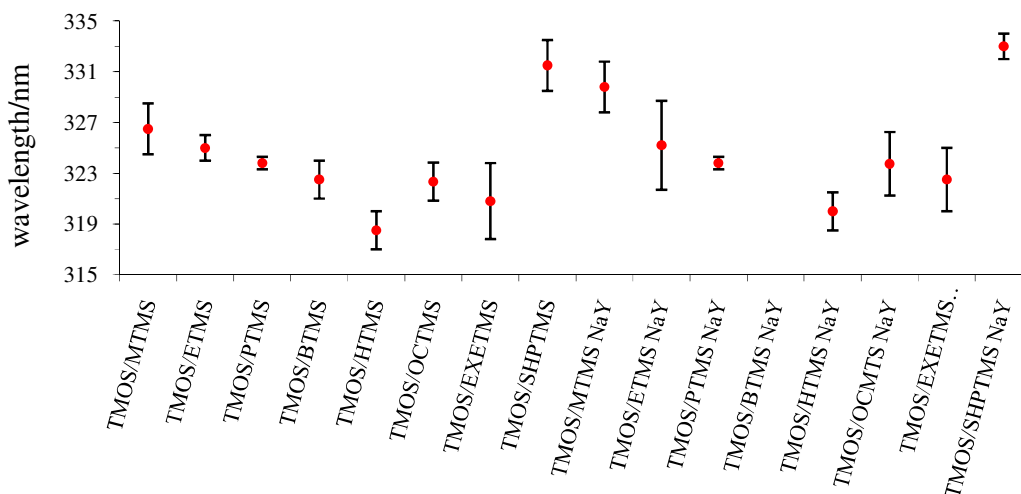


Gráfico 2 – Resultados obtidos com 4 mg de cutinase imobilizada em sol-gel de diversas composições. Apesar de se mostrarem os resultados de todas as composições analisadas, para este trabalho apenas se consideraram os resultados da sequência MTMS até BTMS

Os resultados anteriores revelam uma clara tendência descendente de λ_{\max} à medida que a cadeia de sol-gel aumenta até $n=4$.

Com o aumento da cadeia de sol-gel aumenta o carácter hidrofóbico do material. Como tal, espera-se que a cutinase sinta as características hidrofóbicas da matriz. Sabe-se ainda que o tamanho de poro aumenta com o aumento da cadeia de sol-gel.

Para as medidas de espectroscopia de fluorescência utilizou-se uma célula em forma de prisma triangular, estando uma das faces do prisma com dois vidros. Distribui-se a amostra de modo homogêneo em cima de um dos vidros e com o outro vidro comprime-se a amostra, ficando o pó com um aspecto empacotado e completamente homogêneo. Este é um ponto de extrema importância, uma vez que o feixe tem que irradiar a amostra e se esta não estiver bem distribuída, a intensidade de fluorescência vem afectada (é menor).

Como se sabe através de experiências anteriores, quanto maior for a quantidade de enzima imobilizada na zona do feixe, maior a intensidade da banda emitida pelo grupo triptofano. Também se sabe que aumentos de intensidade de duas ordens de grandeza (no mesmo suporte) indicam que a enzima está desnaturada. Sabe-se ainda que a exposição prolongada a radiação provocam a ruptura das pontes dissulfídicas.

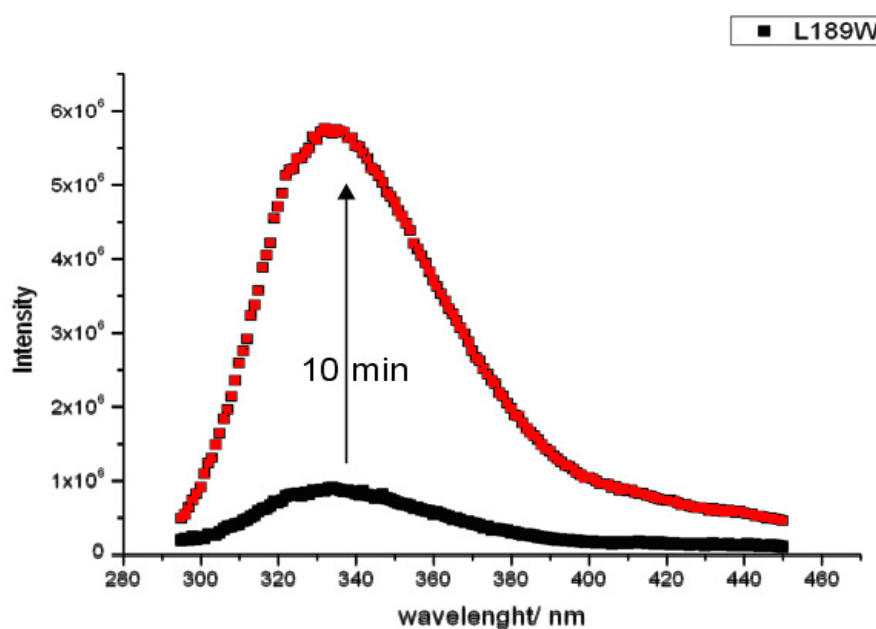


Gráfico 3 – Gráfico ilustrativo do aumento de intensidade devido à exposição prolongada a radiação de cutinase L189W. A primeira medida (a preto) foi efectuada antes de exposição a radiação por 10 minutos. A vermelho surge a medição por Espectroscopia de Fluorescência final. O aumento de intensidade atribui-se à quebra de ligações entre alguns aminoácidos da proteína.

Na posse de todos estes dados e tentando minimizar todos os factores de erro descritos, as medidas são curtas (cerca de 20 segundos) e comparam-se sempre as intensidades com as obtidas anteriormente.

Os tempos de secagem de sol-gel foram ajustados de acordo com as experiências anteriores. A presença excessiva de água provocaria um aumento nos valores de λ_{\max} (aumento de polaridade).

O único factor não controlado é a espessura do pó entre os dois vidros. Tenta-se minimizar este factor através da moagem dos suportes, fazendo um pó o mais fino possível.

Intensidade da banda:

De modo a simular o ambiente mais polar possível, analisaram-se soluções de cutinase de cada mutante. Espera-se, portanto, que os valores de λ_{\max} obtidos em estado sólido sejam inferiores aos que se obtêm em estado líquido.

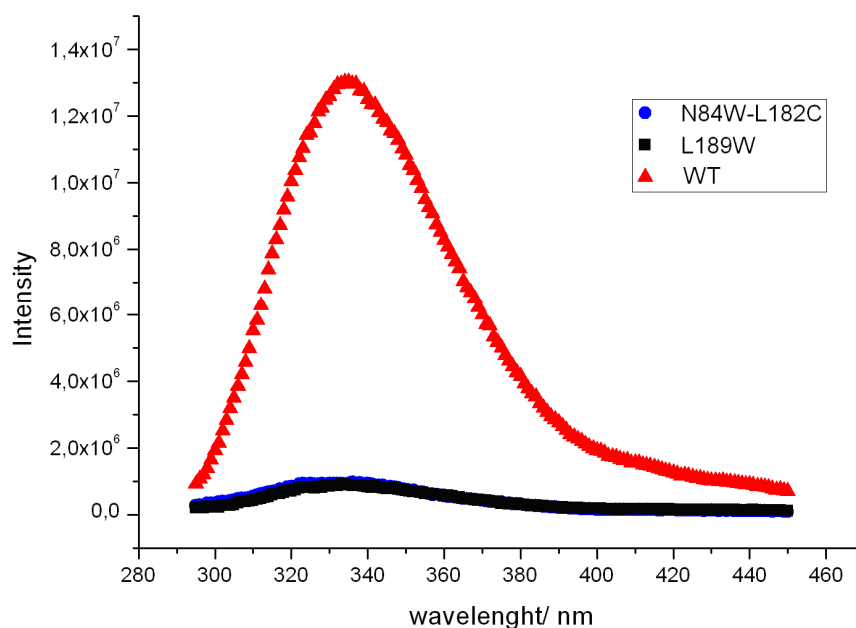


Gráfico 4 – Espectroscopia de Fluorescência com soluções de cutinase wt e mutantes 1mg/ml em tampão fosfato 50mM, pH7.5.

Apesar das intensidades de wt vs. mutantes diferirem em mais de uma ordem de grandeza, os λ_{\max} são sensivelmente os mesmos, como se pode ver pela tabela 5.

Tabela 6 – Valores de λ_{\max} obtidos para cutinase mutante e wt levedura.

Cutinase	Valor de λ máximo (nm)
Wt	334
N84W – L182C	336
L189W	334

Podemos afirmar que a cutinase wt fluoresce com maior intensidade do que os mutantes em ambiente aquoso e que o valor de λ_{\max} encontra abaixo do valor descrito na literatura de 352nm para triptofano livre em solução aquosa.

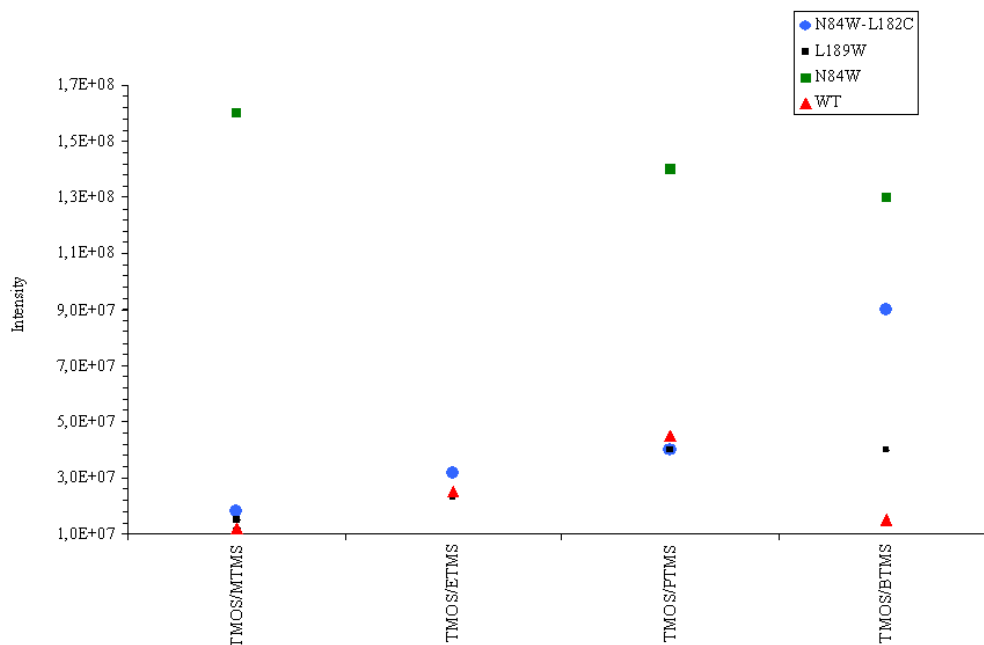


Gráfico 5 – Intensidades específicas de fluorescência de cutinase imobilizada em matriz so-gel. Mutante N84W não segue a tendência crescente dos restantes.

As intensidades de fluorescência seguem uma tendência à medida que se aumenta a cadeia de sol-gel. No caso do mutante N84W essa tendência é decrescente, indicando que os triptofanos vão ficando cada vez menos expostos. Comparando com o wt, verifica-se que a adição do triptofano na posição 84 aumentou a intensidade de emissão e alterou a tendência. O mutante N84W foi o único a apresentar uma tendência decrescente com a diminuição de polaridade.

O mutante N84W-L182C apresenta uma resposta semelhante a wt, tanto a nível de intensidades como a nível de tendência. Verifica-se como previsto, que a adição da cisteína na posição 182 ao mutante N84W faz com que os triptofanos respondam como no wt.

Em relação ao mutante L189W, nada se pode concluir, dado que as intensidades máximas são muito próximas das verificadas com wt.

Há ainda que realçar o afastamento da tendência crescente no mutante L189W e wt no caso do suporte TMOS/BTMS. Para esclarecer esta questão, é necessário fazer mais medições, de modo a poder retirar conclusões.

.Apesar de todos os resultados parecerem indicar uma conclusão comum há um factor que ainda não está esclarecido. As intensidades de cada suporte apresentam uma baixa reprodutibilidade variando consoante o dia de preparação, isto é, apenas se podem comparar resultados entre suportes feitos no mesmo dia. Como já foi referido, quanto maior a fracção de proteína desnaturada, maior a intensidade de fluorescência. Apesar dos esforços para eliminar todos os factores de erro, o que os resultados demonstram é que ainda existem factores que não se compreendem na sua totalidade.

Passamos então à análise dos máximos de λ com os mutantes de cutinase.

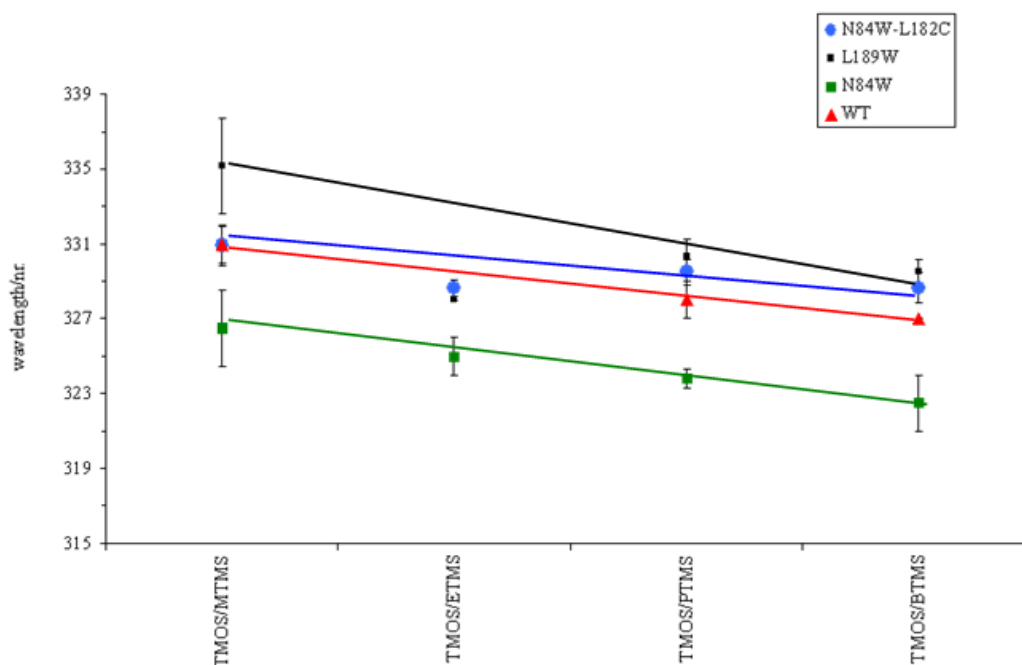


Gráfico 6 – Representação gráfica dos valores médios de λ_{\max} .

Ao aumentar a cadeia de sol-gel, os valores de λ_{\max} decrescem, revelando que o ambiente na vizinhança tiptofano é cada vez mais apolar.

Olhando para o gráfico dos valores médios de λ_{\max} destaca-se o mutante N84W que tem os valores mais baixos (menor polaridade).

Mais uma vez, tal como verificado nas intensidades de fluorescência, a adição da cisteína na posição 182 aproximou o mutante N84W ao wt.

Em relação ao mutante L189W, temos um resultado peculiar. Os suportes de TMOS/MTMS apresentam o valor mais elevado de λ_{\max} (mais elevado do que qualquer resultado obtido até agora à temperatura ambiente). Temos ter aqui um indicador que o triptofano está a sentir o ambiente polar que o rodeia com maior intensidade que a cutinase nativa. No entanto, ao aumentarmos a cadeia de sol-gel de ETMS para PTMS, o triptofano dá a informação que o ambiente que o rodeia é mais polar, quando deveria demonstrar o contrário (tendo em conta os resultados com wt). Este comportamento também é visível no mutante N84W-L182C, ainda que com menor expressão.

Podemos especular que as valinas na posição 183 e 176, ao sentirem o ambiente hidrofóbico, provocam uma distorção na estrutura da cutinase, fazendo com que o triptofano recue e sinta um ambiente mais polar. Para verificar esta hipótese podem-se fazer adições de alcanos ou de solventes cada vez mais polares. Se a hipótese estiver correcta, então o comportamento descrito verificar-se-á.

Efectuaram-se ainda medidas de anisotropia com cutinase em solução. Verificou-se que durante estas medições, devido a exposição prolongada a radiação, a cutinase desnaturava. Assim, não faz sentido analisar estes resultados, uma vez que com a desnaturação os grupos triptofano vão ficando cada vez mais livres.



Conclusões:

É necessário averiguar as razões de uma produção tão baixa de mutante L189W, assim como averiguar as razões da não obtenção de wt (E.Coli).

A produção e purificação de enzima representaram um passo limitante deste trabalho, dada a complexidade e morosidade do processo.

As interações entre a matriz de sol-gel e cutinase ficaram por esclarecer. Apesar da espectroscopia de fluorescência se apresentar como um bom método para a determinação de estruturas de proteínas, neste caso revelou-se inconclusiva devido à complexidade das interações entre proteína e matriz.

Terá de ser realizada uma análise dos tempos de vida com recurso a ciclos de desnaturação térmica, tal como foi feito no trabalho de Martinho *et. al.* (2003) [72], com o intuito de averiguar a existência ou não de fracções desnaturadas na enzima liofilizada.

Os resultados foram esclarecedores na medida em que compreendemos as limitações da técnica utilizada. As medidas de espectroscopia de fluorescência, utilizando o triptofano como sonda, deixam de ser esclarecedoras a partir do momento em que temos dois triptofanos na estrutura da proteína. Aquilo que realmente estamos a ler são somas das contribuições de cada um dos triptofanos, não sendo por isso possível fazer afirmações acerca da vizinhança de um triptofano em particular. Este tipo de afirmações só seria possível se se conseguisse eliminar o triptofano nativo (situação que a experiência nos diz ser impossível).

Bibliografia

- [1] Bommarius, Andreas S. and Riebel, Bettina R. Biocatalysis –WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim ISBN: 3-527-30344-8 2004
- [2] Schwienhorst, A. Advanced Screening Strategies for Biocatalyst Discovery Wiley VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim ISBN: 3-527-600064-7 2002.
- [3] Halling, P., Kvittingen, L. Why did biocatalysis in organic media not take off in the 1930s? – Trends Biotechnol 1999;17(3):85-86.
- [4] Ghanem , A., Aboul H. Application of Lipases in Kinetic Resolution of Racemates. Chirality 2005;17(1):1 – 15.
- [5] Klibanov, A. M. Enzymatic catalysis in organic media at 100 degrees C. Science 1984;224:1249 – 1251.
- [6] Pearson, J. C., Jene, Q., and C. R. Surfactant modified enzymes: Solubility and activity of surfactant-modified catalase inorganic solvents. Enzyme Microb Technol 1997;20(1):69-74.
- [7] Garcia, S., Vidinha, P. Arvana, H., Silva, M.D.R., Ferreira, O., Cabral, J.M.S., Harper, N. Cutinase activity in supercritical and organic media: water activity, solvation and acid–base effect. J Supercritical Fluids 2005;35(1):62-69
- [8] Rupley, J.A., Gratton, E., Careri, G. Water and globular proteins. Trends Biochem Sci 1983;8:18–22.
- [9] Rupley, J.A., Careri, G. Protein hydration and function. Adv. Protein Chem 1991;41:37–172.
- [10] Bell, G., Halling, P.J., Moore, B.D., Partridge, J., Rees, D.G. Biocatalyst behaviour in low-water systems. Trends Biotechnol 1995;13:468–473.

- [11] Halling, P.J. Thermodynamic predictions for biocatalysis in nonconventional media: theory, tests and recommendations for experimental design and analysis. *Enzyme Microb Technol* 1994;16:178–206.
- [12] Bovara R., Carrea G., Ottolina G., Riva S. Water activity does not influence the enantioselectivity of lipase ps and lipoprotein lipase in organic solvents. *Biotechnol Lett* 1993;15:169–174.
- [13] Bell, G., Janssen, A.E.M., Halling, P.J. Water activity fails to predict critical hydration level for enzyme activity in polar organic solvents: interconversion of water concentrations and activities. *Enzyme Microb Technol* 1997;20:471–477.
- [14] Kim, J., Clark, D.S., Dordick, J. S. Intrinsic Effects of Solvent Polarity on Enzymic Activation Energies. *Biotechnol Bioeng* 2000;67:112-116.
- [15] Gomez-Puyou, M.T., Gomez-Puyou, A. Enzymes in low water Systems. *Critical Rev Biochem Mol Biol* 1998;33:53–89.
- [16] Sarkar, R. et al, Ultrafast surface solvation dynamics and functionality of an enzyme a-chymotrypsin upon interfacial binding to a cationic micelle. *J of Photochem Photobiol B: Biology* 2005;79:67–78.
- [17] Rotticci, D. et al, Improved Enantioselectivity of a Lipase by Rational Protein Engineering. *ChemBioChem* 2001;2:766-770.
- [18] Raza, S., Fransson, L., Hult, K. Protein Science. Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001;10:329–338.
- [19] Hæffner, F., Norin, T., and Hult, K. Molecular modeling of the enantioselectivity in lipase-catalyzed transesterification reactions. *Biophys J* 1998;74:1251–1262.
- [20] Holmquist, M., Hæffner, F., Norin, T., and Hult, K. A structural basis for enantioselective inhibition of *Candida rugosa* lipase by long-chain aliphatic alcohols. *Protein Sci* 1996;5:83–88.



- [21] Berglund, P., Vallikivi, I., Fransson, L., Dannacher, H., Holmquist, M., Martinelle, M., Bjorkling, F., Parve, O., and Hult, K. Switched enantioselectivity of Humicola lipase for 2-phenoxyalkanoic acid ester homologs can be rationalized by different substrate binding modes. *Tetrahedron: Asymmetry* 1999;10:4191–4202.
- [22] Tuomi, W.V. and Kazlauskas, R.J. Molecular basis for enantioselectivity of lipase from *Pseudomonas cepacia* toward primary alcohols. Modeling, kinetics, and chemical modification of Tyr29 to increase or decrease enantioselectivity. *J Org Chem* 1999;64:2638–2647.
- [23] Schulz, T., Pleiss, J., and Schmid, R.D. Stereoselectivity of *Pseudomonas cepacia* lipase toward secondary alcohols: A quantitative model. *Protein Sci* 2000;9:1053–1062.
- [24] Scheib, H., Pleiss, J., Kovac, A., Paltauf, F., and Schmid, R.D. Stereoselectivity of *Mucorales* lipases toward triacylglycerols: A simple solution to a complex problem. *Protein Sci* 1999;8:215–221.
- [25] Matsushima, A. et al. Bioconjugates of proteins and polyethylene glycol: potent tools in biotechnological processes. *J Molec Catal* 1996;2:1-17.
- [26] K. Takahashi, Y. Saito and Y. Inada Synthesis of (+/-) marismic acid via 1-oxiaspirohexane rearrangement. *J American soc* 1988;65:911.
- [27] Y. Inada, K. Takahashi, T. Yoshimoto, A. Ajima, A. Matsushima and Y. S. Application of polyethylene glycolmodified enzymes in biotechnological processes: organic solvent-soluble enzymes. *Trends Biotechnol* 1986;4:190.
- [28] Inada, Y., Furukawa, M., Sasaki, H., Hiroto, M. Nishimura, H., Matsushima, A., Biomedical and biotechnological applications of PEG- and PM-modified proteins. *Trends Biotechnol* 1995;13:86-91.

- [29] Ayelet Fishman, Uri Cogan Bio-imprinting of lipases with fatty acids. *J Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2003;22:3-4.
- [30] C.J. Slade, E.N. Vulfson Induction of catalytic activity in proteins by lyophilization in the presence of a transition state analogue. *Biotechnol Bioeng* 1998;57:211.
- [31] K. Faber *Biotransformations in Organic Chemistry*. fourth edition, Springer-Verlag, Berlin. 2000;400–401.
- [32] Fishman, A, Cogan, U. Bio-imprinting of lipases with fatty acids. *J Mol Catal B: Enzymatic* 2003;22:193-202.
- [33] Griebenow, Klibanov, K., A.M. On protein denaturation in aqueousorganic mixtures but not in pure organic solvents *J of American Chem Soc* 1996
- [34] Russel, A.J. I, Klibanov, A.M. Inhibitor-induced enzyme activation in organic solvents. *J Biological Chem* 1988;263:11626.
- [35] http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1993/illpres/pcr.html
- [36] Yon, J. & Fried, M. (1989) Precise gene fusion by PCR. *Nucleic Acids Research*. 17.
- [37] <http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/rachakonda-p-sivaramakrishna-2005-02-15/HTML/image007.jpg>
- [38] W. Bi and Stambrook, P. J. Site-directed mutagenesis by combined chain reaction. *Analytical Biochem* 1998;256:137–140.
- [39] T. A. Kunkel () Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1985;82:488–492.
- [40] You et al. Line shapes for light scattered from Bose-Einstein condensates. *Atomic, Molecular, and Optical Physics* 1994;50:5
- [41] Sotiropoulou¹, S., Nikos A. Chaniotakis Tuning the sol–gel microenvironment for acetylcholinesterase encapsulation. *Biomaterials* 2005;26:33.

- [42] Vidinha, P. et al. Sol-gel encapsulation: an efficient and versatile immobilization technique for cutinase in nonaqueous media. *J Biotechnol* 2003;121
- [43] Cabral, J. M. S., Aires-Barros, M. R., Gama, M. Engenharia Enzimática. Lidel. Lisboa 2003
- [44] Bickerstaff, G. F. Immobilization of Enzymes and Cells. Humana Press; New Jersey 1997
- [45] Reetz, M.T., Tielmann, P., Wisenhöfer, W., Könen, W., Zonta, A. Second generation sol-gel encapsulated lipases: robust heterogeneous Biocatalysts. *Adv Synth Catal* 2003;345:717–728.
- [46] Hunt, A. e Ayers, M. A Brief History of Silica aerogels.
- [47] S.J. Teichner, G.A. Nicolaon, M.A. Vicarini and G.E.E. Gardes Inorganic Oxide Aerogles. *Adv Colloid Interface Sci* 1976;5
- [48] Gill, I. Bio-doped Nanocomposite Polymers: Sol-Gel Bioencapsulates. *Chem. Mater* 2001;13:3404-3421.
- [49] DeSimone, J.M. Practical approaches to green solvents. *Science* 2002;297:799–803.
- [50] Woonchang Lee^b, Ki-Suk Park^a, Yong-Wan Kim^a, Won Hong Lee^a, Jeong-Woo Choi^a Protein array consisting of sol-gel bioactive platform for detection of E. coli O157:H7. *Biosens Bioelectron* 2004;20(11):2292-9.
- [51] Eggers, Daryl K., Valentine, Joan S. Molecular confinement influences protein structure and enhances protein stability. *Protein Sci* 2001;10:250-261.
- [52] Nuno, João, - Relatório de estágio: Influência de Alterações na Composição da Matriz de Sol-Gel na Actividade Catalítica da Cutinase. Univ. Lusófona, 2005
- [53] Fidalgo, A. – Tese de doutoramento: Síntese de Materiais de Porosidade Controlada pelo Processo Sol-Gel: dos Xerogeis aos Aerogeis de Sílica. IST-UNL. 2003



- [54] Hüsing, N. e Schubert, U. Airy Materials: Chemistry, Structure and Properties. *Angew. Chem. Int. Ed* 1998;37:22-45.
- [55] Coradin, T. e Lopez, P.I J. Biogenic Silica Patterning: Simple Chemistry or Subtle Biology. *ChemBioChem*. 2003;4:251-259.
- [56] Pierre, A. C.; Pajonk, G. M. Chemistry of Aerogels and Their Applications. *Chem Rev*. 2002;102:4243-4265.
- [57] Anders O. Magnusson, Mohamad Takwa, Anders Hamberg, and Karl Hult AnS-Selective Lipase Was Created by Rational Redesign and the Enantioselectivity Increased with Temperature. *Angewandte Chemie-international Edition in English*. 2005;44:4582 –4585.
- [58] Ashraf Ghanem and Hassan Y. Aboul-Enein Application of Lipases in Kinetic Resolution of Racemates. *Chirality* 1995;17:1–15.
- [59] Hæffner, Torbjørn et al. Molecular Modeling of the Enantioselectivity in Lipase-Catalyzed Transesterification Reactions. *Biophys J* 1998;74:1251–126.
- [60] Serralha, F. Tese de doutoramento Utilização de zeólitos para a imobilização de uma cutinase recombinante. IST-UTL 2000
- [61] Norihiro K. Enantioselective Recognition Mechanism of Secondary Alcohol by Surfactant-Coated Lipases in Nonaqueous Media. *Biotechnol bioeng* 1999;65:2
- [62] Kuncová, G.; Szilva, J., Hetfleiter, J. e Sabata, S. Catalysis in Organic solvents with Lipase immobilized by Sol-Gel Technique. *J. Sol-Gel Sci. Technol* 2003; 26:1183-1187.
- [63] Verger, V. Interfacial activation of lipases: facts and artifacts. *Tibetech* 1997;15.
- [64] Ribeiro, Inês Isabel Relatório de Estágio Imobilização de enzimas em materiais baseados em gelatinas. FCT-UNL 2006

- [65] Jaeger, K. E., Ransac, S., Dijkstra, B. W., Colson, C., van Heuvel, M e Misset, O. Bacterial lipases. *FEMS Microbiol Rev* 1994;15:29-63.
- [66] Patel, R. N. Enzymatic synthesis of chiral intermediates for drug development. *Adv. Synth. Catal* 2001;343:527-546.
- [67] Iso, M., Chen, B., Eguchi, M., kudo, T., Shrestha, S. Production of biodisel fuel from triglycerides and alcohol used immobilized lipase. *J Mol Catal B: Enzymatic* 2001;16:53-58
- [68] Carvalho, C.M.L., Aires-Barros M.R., Cabral, J.M.S. Cutinase: from molecular level to bioprocess development. *Biotechnol. Bioeng.* 1999;66:17–34.
- [69] Chikuza, Y., et al. (2003) There's no industrial biocatalyst like hydrolase. *Org. Process Res. Dev.* 2003;7:289–296.
- [70] Fernandes, S., Johansson G., Hatti-Kaul R. Purification of recombinant cutinase by extraction in aqueous two-phase system facilitated by a fatty acid substrate. *Biotechnol Bioeng* 2001;73:465-475.
- [71] Vidinha et al. Sol-gel encapsulation : An efficient and versatile immobilization technique for cutinase in non-aqueous media. *J of biotechnol* 2006;121:23-33.
- [72]., Martinho, J. M. G, Santos, A.M., Fedorovi, A., Baptista, R. P., Taipa, M. A., Cabral, J. M. S. Fluorescence of the Single Tryptophan of Cutinase: Temperature and pH Effect on Protein Conformation and Dynamics. *Photochem Photobiol* 2003;78(1): 15–22

Anexos: Resultados experimentais suplementares

Anexo 1 – Resultados Globais:

Tabela 7 – Média dos resultados obtidos anteriormente para mutante N84W

Cutinase N							Média
TMOS/MTMS	332	326	328	324	328		327,6
TMOS/ETMS	328	324	326	325			325,8
TMOS/PTMS	324	324	323	324	324		323,8
TMOS/BTMS	328	321	329	324			325,5
TMOS/HTMS	317	320					318,5
TMOS/OCTMS	328	322	329	321	324		324,8
TMOS/EXETMS	318	319	319	324	324		320,8
TMOS/SHPTMS	333	329	330	332	333	332	331,5
TMOS/MTMS NaY	332	329	328	328	332		329,8
TMOS/ETMS NaY	322	323	324	328	329		325,2
TMOS/PTMS NaY	326	322	321	324	330	326	324,8
TMOS/BTMS NaY	330	323	324	330	329		327,2
TMOS/HTMS NaY	319	319	322				320,0
TMOS/OCMTS NaY	321	323	329	325	326		324,8
TMOS/EXETMS NaY	322	321	321	331	326		324,2
TMOS/SHPTMS NaY	334	332	333	333			333,0

Tabela 8 – Média dos resultados obtidos anteriormente com cutinase wt

Cutinase Wt							Média
TMOS/MTMS	331	332				330	331
TMOS/PTMS	329					327	328
TMOS/BTMS	327	327	327	327	330	327	327,5
TMOS/OCTMS	327					326	326,5
TMOS/EXETMS	326					328	327
TMOS/MTMS NaY	332					332	332
TMOS/PTMS NaY	330					327	328,5
TMOS/BTMS NaY	331					330	330,5
TMOS/OCMTS NaY	331					326	328,5
TMOS/EXETMS NaY	333					332	332,5



Anexo 2 – Crescimento *E.Coli* para extracção DNA

Para as células XL1 Blue (a partir de placa Agar):

Preparar 20ml meio LB+20uL Ampicilina + 40uL Tetraciclina

Dividir meio e antibióticos preparados por dois Erlenmeyers

Inocular apenas um dos Erlenmeyers, o outro servirá de controlo de esterilidade

Deixar a crescer overnight, 37°C

Para células WK6 (a partir de células congeladas):

Preparar 20ml meio LB+20uL Ampicilina

Dividir meio e antibióticos preparados por dois Erlenmeyers

Inocular apenas um dos Erlenmeyers, o outro servirá de controlo de esterilidade

Deixar a crescer overnight, 37°C



Anexo 3 – Protocolo extracção DNA, Stratagene Kit

Protocolo realizado com células XL1 Blue

Centrifugar 5 minutos, 8000 RPM, 6uL células

Remover Sobrenadante

Adicionar 250uL solução P1, ressuspender

Adicionar 250uL solução P2 e esperar 5 minutos

Adicionar 250uL solução N3

Centrifugar 10 min, 13000 RPM, 4°C

Colocar sobrenadante na mini coluna do kit

Centrifugar 1 min, 13000RPM

Remover sobrenadante

Adicionar 750 uL PE

Centrifugar 1 min, 13000RPM e remover sobrenadante

Colocar a mini coluna em eppendorf 1.5 ml

Adicionar 40 ul H₂O, esperar 1 minuto

Centrifugar 1 minuto, 13000 RPM

Protocolo realizado com células WK6

Centrifugar 5 minutos, 8000 RPM, 6uL células

Remover Sobrenadante

Adicionar 250uL solução P1, ressuspender

Adicionar 250uL solução P2 e esperar 5 minutos

Adicionar 250uL solução N3



Centrifugar 10 min, 13000 RPM, 4°C

Colocar sobrenadante na mini coluna do kit

Centrifugar 1 min, 13000RPM

Remover sobrenadante

Lavar coluna com 0.5 ml French Pass Buffer

Centrifugar 1 minuto, 13000 RPM

Remover sobrenadante

Adicionar 750 uL PE

Centrifugar 1 min, 13000RPM e remover sobrenadante

Colocar a mini coluna em eppendorf 1.5 ml

Adicionar 40 ul H₂O, esperar 1 minuto

Centrifugar 1 minuto, 13000 RPM

Anexo 4 – Protocolo Transformação, ITQB

Efectuar PCR, segundo as tabelas:

Tabela 9 – Volumes a utilizar para reacção de PCR

	“WK6 DNA” Volume (ul)	Control Volume (ul)
H ₂ O	31	37.5
DNA	1	1
Buffer	10	10
“Primer 17”	1	--
“Primer 18”	1	--
dNTP	4	--
DMSO	1.5	1.5
Phusion	0.5	--

Tabela 10 – Programa a utilizar com aparelho PCR

Temperatura (°C)	Tempo (min)	12 ciclos
98	30	
98	30	
65	30	
72	2.3	
72	7	
4	infinito	



Adicionar 1ul dpnI a cada produto PCR e deixar overnight a 37°C

Os passos seguintes serão realizados para o produto de PCR “WK6” e controlo

Inactivar 80°C durante 20 minutos

Dialisar 30 minutos

A 15ul de produto PCR adicionar 140ul células XL1 Blue + 1.5 ul solução CaCl₂, 1M Colocar 50 minutos no gelo

Colocar 1.30 min. No banho a 42°C

Colocar 5 minutos no gelo

Adicionar 860 ul meio LB líquido e manter a 37°C por 30 min.

Centrifugar 5 min a 3000 RPM e remover meio LB

Plaquear e deixar overnight a 37°C

Anexo 5 – Protocolo de produção de enzima utilizado no ITQB

Inocular células de uma colônia 10 ml meio LB + antibiótico (no caso da estirpe estar congelada a -80°C, levar a ansa de repicagem ao rubro, tocar na superfície de células congeladas e tocar com ansa no meio de crescimento líquido).

Deixar crescer a 37°C, até OD₆₀₀=0.6

Induzir com IPTG (0.1mM) e deixar a crescer 3 horas a 37°C, 150RPM

Centrifugar 2ml células 5 minutos, 13000RPM

Ressuspender em 100 ml French Pass Buffer

Adicionar 11ul Lisozima (1mg/ml)

Colocar 10 minutos a 37°C

Congelar células com azoto líquido

Colocar no banho a 37°C durante 5 minutos. Repetir este passo e o anterior 3 vezes

Adicionar PMSF (12ul) e Benzonase (1ul) e colocar 10 minutos a 37°C

Centrifugar 10 minutos a 4°C

Guardar sobrenadante (representa a parte solúvel de proteína)

Ressuspender pellet em 100ul French Pass Buffer



Anexo 6 – Protocolo de produção de enzima utilizado no IST

PRODUCTION, EXTRACTION AND PURIFICATION OF RECOMBINANT CUTINASE FROM *Fusarium solani pisi*

AUTHOR: Isabel Sousa and Sara Badenes

DATE: 15 April 2008

REVISION: 0

OBJECTIVE

Production, extraction and purification of cutinase from *Fusarium solani pisi* using a recombinant *E. coli* strain.

NOTE

This protocol is described for a basis of 1L of fermentation medium but can easily be performed for 2L of fermentation medium.

NECESSARY EQUIPMENTS

- Orbital shaker
- Analytical Balance
- Autoclave



- Ice Machine
- Centrifuge (Sorvall RC-6) with rotor and appropriate centrifuge tubes
- Stirring plate
- Spectrophotometer
- Vacuum pump
- AKTA
- Lyophilizer

MATERIAL TO STERILIZE

- Shake flasks containing the fermentation and pre-fermentation media
- Pipette tips (yellow/200 μ l and blue/1000 μ l) in adequate boxes
- Pipette tips (white/5 or 10 ml) or in alternative use sterile pipettes (5 and 10 ml)
- Containers with lid to prepare the antibiotic and IPTG solutions (*e.g.* falcon tubes)
- Flask with solution of MgSO_4 (1M)
- Culture Plate medium (if necessary to prepare new plates)

SOLUTIONS PREPARATION

Antibiotic (ampicillin or chloramphenicol) and IPTG solutions:

If ampicillin is used, prepare 5 mL of a 100 mg/ml solution (in distilled water).

If chloramphenicol is used, prepare 5 mL of a 20 mg/ml solution (in methanol).

Prepare an IPTG solution with a concentration of 0.5 M.



Sterilize solutions by filtration with a syringe filter of 0.2 μm pore size, in a sterile environment.

PROCEDURE

1. PRODUCTION

1.1 Culture plate preparation (prepare in sterile environment)

1.1.1 Culture Plate medium:

Composition: 20 g/L of agar and 20 g/L of LB medium

For 250 ml weigh 5 g of LB and 5 g of agar

1.1.2 After autoclaving let the medium (250 ml) cool down to about 40°C and add 375 μl of ampicillin (to obtain a final concentration of 150 $\mu\text{g/ml}$), or 313 μl of chloramphenicol (to obtain a final concentration of 25 $\mu\text{g/ml}$).

1.1.3 Divide by the plates (sterile)

1.1.4 After solidification of the medium plates can be stored at 4°C.

1.2 Culture plate inoculation (perform in sterile environment)

1.2.1 If the plates were stored at 4°C, let them heat up at least 30 min at laboratory temperature and dry them upside down 50°, 5 min.

1.2.2 Inoculate the plates from frozen slants and incubate at 37°C overnight

Microorganism: *E. coli* WK-6 harbouring pMa5-L.

1.3 Pre-fermentation

1.3.1 Prepare 150 ml of LB medium and add 50ml to each 250 ml shake flask.

1.3.2 After autoclaving let it cool down before adding ampicillin (75 μ l) or chloramphenicol (63 μ l) to each shake flask containing 50 ml of sterile medium.

1.3.3 Inoculate with a colony from the culture plate and incubate at 37°C, 250 rpm, until a O.D. (600 nm) is reached that allows the fermentation to start with an O.D. between 0.1 and 0.2. To measure the O.D. use an adequate dilution (1:10 should be enough). Use the following equation to find the inoculum volume (V_i):

$$\text{O.D.}_f \times V_f = \text{O.D.}_i \times V_i$$

Where,

O.D._i is the inoculum optical density

O.D._f is the initial fermentation desired optical density (~ 0.15)

V_f is the fermentation volume (in each shake flask) *i. e.* ~ 250 ml (neglecting the inoculum volume)

For example, if O.D._i is 3 then V_i is about 12.5 ml to start fermentation with $\text{O.D.}_f \sim 0.15$.

1.4 Fermentation

1.4.1 Prepare 1 L of TB medium (pH ~ 7.1):

-Tryptone, 12 g

-Yeast extract, 24 g

-Glycerol, 5 ml

- KH_2PO_4 , 3.81 g

- K_2HPO_4 , 12.51 g



1.4.2 Divide by four 2 L shake flasks (250 ml in each) and autoclave. A solution of MgSO_4 (1M) is autoclaved separately to avoid precipitation. Before inoculation, add 2 ml of MgSO_4 solution to each 100 ml of medium (*i.e.* 5 ml per shake flask). A volume of 313 μl of chloramphenicol (20 mg/ml) or 375 μl of ampicillin (100 mg/ml) is also added to each 250 ml of medium (let it cool before addition).

1.4.3 Inoculate with the appropriate volume from pre-fermentation, such that O.D._f is between 0.1 and 0.2 (see section 1.3.3).

1.4.4 Incubate at 25 °C, 250 rpm.

1.5 Induction

1.5.1 When O.D.(600nm) reaches ~ 1.0 (usually after a couple of hours) induce the production of cutinase by adding 50 ml of IPTG (0.5 M).

1.5.2 At the time of induction add an ampicillin (125 μl) reinforcement.

1.5.3 Proceed with the fermentation for $\pm 16\text{h}$ or until the O.D. is about 15-20, in the same conditions (25°C, 250 rpm).

2. EXTRACTION

Collect the fermentation medium and centrifuge at 9000 rpm, 4°C for 15 min. Reject the supernatant (for treatment by autoclaving).

2.1 Osmotic shock

2.1.1 Prepare 250 ml of STE buffer (Sucrose, Tris, EDTA) with:

-This.HCl (1M, pH 8.5) - 62.5 ml

-Sucrose - 50 g (20%, (p/v))

- EDTA - 1.3 g (12.5 mM)



2.1.2 Resuspend the cells completely in the buffer (40 ml for each 250 ml of fermentation medium)

2.1.3 Centrifuge (9000 rpm, 4°C, 30 min.)

2.1.4 Collect the supernatant and keep it on ice (or at the cold chamber). Take note of the volume and take a small sample for determination of activity and protein.

2.1.5 Resuspend the cells completely in cold water (40 ml for each 250 ml of fermentation medium) and wait 30 min (use ice to keep the resuspended cells cool)..

2.1.6 Centrifuge (9000 rpm, 4°C, 30 min.)

2.1.7 Keep the supernatant in ice. Take note of the volume and take a small sample for determination of activity and protein.

2.1.8 Pool the fractions with activity. Take note of the volume.

3. PURIFICATION

3.1 Acid Precipitation

3.1.1 Add acetic acid 1:2 (v/v) to the enzymatic extract until a pH of 4.7 is reached. Perform this operation with strong stirring to prevent very high local concentrations of acid and to promote precipitation of contaminants. If pH accidentally goes below 4.7, readjust with Tris.HCl buffer (pH 8.5).

3.1.2 Leave overnight at 4°C with gentle stirring.

3.1.3 Centrifuge (9000 rpm, 4°C, 40 min.)

3.1.4 Filter through filter paper using a large Buchner funnel and a vacuum pump. While filtering don't let the filter dry in order to avoid foam formation.

3.1.5 Take note of the volume and take a small sample for determination of activity and protein.



3.2 Dialysis

3.2.1 To prepare dialysis tubing (or sleeves) follow a separate protocol (Preparation of Cellulose dialysis tubing).

3.2.2 Always use gloves to handle the tubing. Wash them well on the inside and on the outside with distilled water (three times distilled water should be enough). Make a knot on one end of each tube.

3.2.3 Fill the tubing with the aid of a funnel (until about 2/3 of the volume). Expel all air and close the open end with an appropriate closure.

3.2.4 Place the filled tubing in 10 L of buffer (Tris.HCl, 20 mM, pH 7.6) and leave at 4°C with magnetic stirring for 48 h. During this time exchange the buffer 3 times. Fresh buffer should already be at 4°C.

3.2.5 Take note of the volume of extract after the dialysis and take a small sample for determination of activity and protein.

3.3 Chromatographic process – AKTA Purifier

3.3.1. Preparation of columns

The following preparation can be carried out on the previous day to which the purification will be carried out if desired.

3.3.1.1. Prepare Tris-HCl 20 mM, pH 7.6 buffer (2L).

3.3.1.2. Ligar o computador e o AKTA. Abrir o programa UNICORN 5.1.1.(ask for the username and password).

3.3.1.3. Wash system with 1L of distilled water. Programming in manual: Set Flow and SampleFlow_960 to 50 ml/min, valve V6 to position 3 (A13) and enable Alarm_AirSensor1.

Press *execute* to start the program and exit by pressing *END*.



3.3.1.4. Connect the top of the DEAE column to injection valve (V1) position 1 and the bottom to the green tube from Optical Unit (UV cell). The top of the Q-sepharose column is connected directly to the green tube from the Sample Pump (P-960) and the bottom is connected to V1 position 2.

3.3.1.5. If both columns have not been used for some time then it is necessary to reequilibrate the columns with fresh Tris-HCl 20 mM, pH 7.6. Both columns can be equilibrated at the same time when they are connected as described in 3.3.1.3. Inlet tubes (that go to buffer valve (V6) position 3 and sample valve (V5) position 1) are fully immersed in the buffer. Programming in manual: Set Flow and SampleFlow_960 to 25 ml/min, valve V6 to position 3 (A13), high alarm of Alarm_Pressure and Alarm_PressureSample_960 to 0.27 MPa and enable Alarm_AirSensor1. Press *execute* to start the program. Allow passage of 2 litres, verify if pH at the bottom of each column is at 7.6. This program is exited by pressing *END*.

3.3.2. Sample application

3.3.2.1. Prepare Tris-HCl 20 mM, pH 7.6 buffer (4L).

3.3.2.2. The sample (cutinase after dialyses) is fed to the DEAE column via pump A. Inlet tube (that goes to A13) is fully immersed in the sample. Place outlet tube from Conductivity Cell (that corresponds to DEAE column outlet) and the inlet tube of V5 position 1 (that corresponds to Q-sepharose column inlet) in the same measuring cylinder.

3.3.2.3. Run the “Cutinase load” program.

3.3.2.4. When all sample is loaded into the column fill the sample recipient with buffer Tris-HCl 20 mM, pH 7.6. Continue the program until all cutinase has passed through the column. Measure cutinase activity at the outlet of DEAE column.



3.3.2.5. Disconnect DEAE column. With manual programming set only SamplePump_960 to 25 ml/min and set the Alarm_PressureSample_960 to 0.27 MPa. Allow the remaining contents of the measuring cylinder to load onto the Q-sepharose column.

3.3.2.6. When this is complete, fill the measuring cylinder with buffer. Continue the program to allow the passage of 1L of buffer to wash the column before ending program.

3.3.3. Elution procedure

3.3.3.1. Prepare NaCl 1M in Tris-HCl 20 mM, pH 7.6 buffer (2L) of and Tris-HCl 20 mM, pH 7.6 buffer.

3.3.3.2. Connect the top of the Q-sepharose column to V1 position 1 and the bottom to the green tube from Optical Unit (UV cell). Inlet tube B (that goes to pump B) is immersed in NaCl solution and inlet tube that goes to A13 in Tris-HCl buffer.

3.3.3.3. Fill pump B with NaCl solution through pump purge using a syringe.

3.3.3.4. Run the “elution” program.

3.3.3.5. Sample collection is done manually from outlet tube of Q-sepharose column. Looking at UV curve, cutinase is the second peak after an initial minor peak. Collection should be done in fractions. Keep fractions at 4°C.

3.3.3.6. Pass Tris-HCl buffer until the end of the program.

3.3.3.7. Take note of the volume of each fraction and take a small sample for determination of activity and protein.

3.3.4. Washing

3.3.4.1. Prepare 1M NaOH (2L) and Tris-HCl 20 mM, pH 7.6 buffer (5L).

3.3.4.2. Connect columns to the system as in section 3.3.1.4. Inlet tube of A13 is fully immersed in Tris-HCl buffer and inlet tube of A12 is in NaOH solution. Place outlet tube from



Conductivity Cell (that corresponds to DEAE column outlet) and the inlet tube of V5 position 1 (that corresponds to Q-sepharose column inlet) in the same measuring cylinder.

3.3.4.3. Run the “wash total” program.

3.3.4.4. After 50 min *Pause* program to place inlet tube of V5 position 1 immersed in Tris-HCl buffer and outlet tube from DEAE column to waste. Click *Continue*.

3.3.4.5. Pass Tris-HCl buffer until the end of the program and measure pH at the end of each column.

3.3.4.6. If pH is not at 7.6 (± 0.1), pass Tris-HCl buffer by manual programming. See section 3.3.1.5. This program is exited by pressing *END*.

3.3.5. Storage of columns and AKTA

3.3.5.1. Prepare 20% ethanol (2L) and distilled water (2L).

3.3.5.2. Pass 2L of distilled water through columns and system to avoid salt precipitation. See section 3.3.1.5.

3.3.5.3. Pass 20% ethanol through columns and system. DEAE and Q-sepharose columns can be stored in 20% ethanol at 4°C.

3.4 2nd Dialysis

3.3.1. See section 3.2.

3.3.2. Fill in different dialysis sleeves the different fractions.

3.3.3. Place the filled tubing in 10 L of distilled water and leave at 4°C with magnetic stirring for 24 h. During this time exchange the water 2 times. Fresh water should already be at 4°C.

3.3.4. Take note of the volume of each fraction after the dialysis and take a small sample for determination of activity and protein.



WASTE DISPOSAL

Biological Material – decontaminate all biological material by autoclaving.

BIBLIOGRAPHY

Lauwereys, M., P. de Geus, et al. (1991). GBF Monographs. R. D. Schmid, L. Alberghina and R. Verger. Weinheim, VCH. **16**: 243-251.

Sebastiao, M. J., J. M. S. Cabral, et al. (1996). "Improved purification protocol of a *Fusarium solani* pisi recombinant cutinase by phase partitioning in aqueous two-phase systems of polyethylene glycol and phosphate." Enzyme and Microbial Technology **18**(4): 251-260.

Anexo 7 – Gráficos de purificação

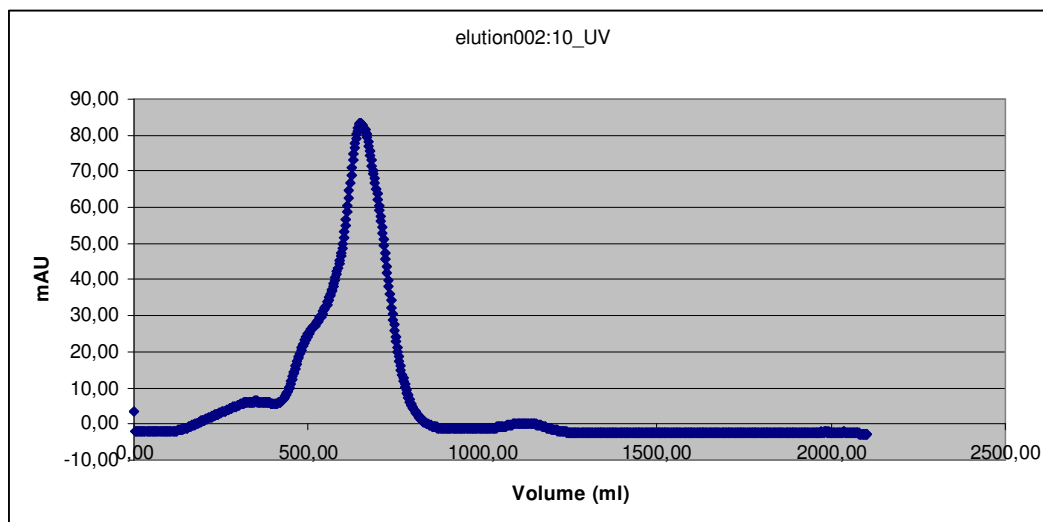


Gráfico 7 – Intensidade UV 280 na purificação de cutinase L182C

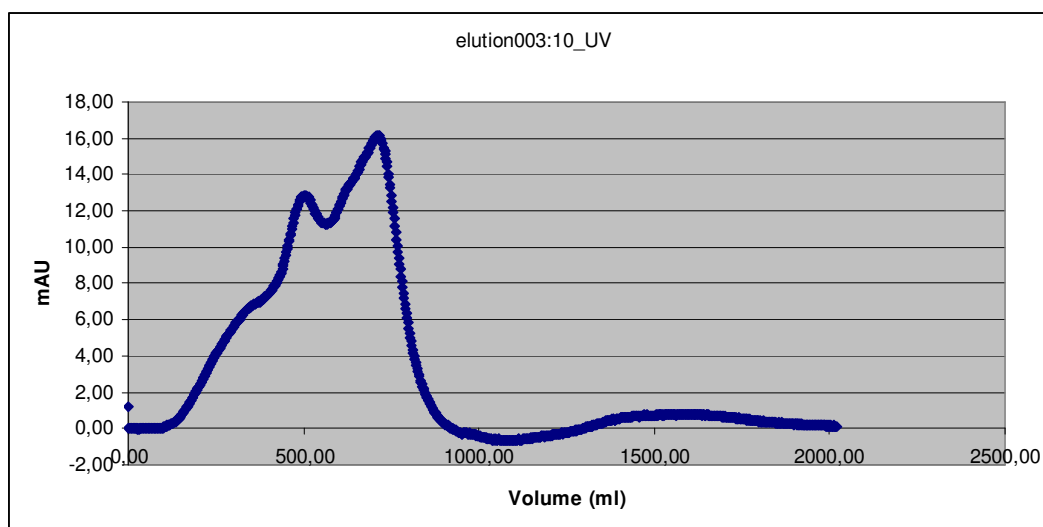


Gráfico 8 – Intensidade UV 280 na purificação de cutinase L182C.